UNIVERSITÉ PARIS VII

THÈSE

PRÉSENTÉE POUR OBTENIR LE GRADE
DE DOCTEUR ÈS-SCIENCES

par

DENIS BARRITAULT

Sujet : Contribution à l'étude de la structure du ribosome d'*Escherichia coli.*

Soutenue le 24 janvier 1975, devant la Commission d'examen :

M. F. CHAPEVILLE, *Président*

M. J.P. EBEL
M. F. GROS
Mme M. GRUNBERG MANAGO
M. D. HAYES
M. R. MONIER, *Examinateurs*

UNIVERSITÉ PARIS VII

THÈSE

PRÉSENTÉE POUR OBTENIR LE GRADE
DE DOCTEUR ÈS-SCIENCES

par

DENIS BARRITAULT

Sujet : Contribution à l'étude de la structure du ribosome d'*Escherichia coli.*

Soutenue le 24 janvier 1975, devant la Commission d'examen :

M. F. CHAPEVILLE, *Président*

M. J.P. EBEL
M. F. GROS
Mme M. GRUNBERG MANAGO
M. D. HAYES
M. R. MONIER, *Examinateurs*

UNIV.
LEIDEN
BIBL.

A mes parents,

à ma femme,

à ma fille,

à mon frère,

à ma soeur,

Digitized by the Internet Archive
in 2026

https://archive.org/details/IA41549913_0009

Je tiens ici à exprimer ma très profonde reconnaissance à Monsieur le Docteur D.H. Hayes, qui a dirigé ce travail avec beaucoup de clairvoyance et de persévérance et a su confirmer ma vocation de chercheur. J'espère savoir tirer profit de ses enseignements et avoir assimilé sa logique rigoureuse de la démarche scientifique.

Monsieur le Professeur F. Gros, en m'accueillant dans son laboratoire lors de mes débuts de chercheur a toujours manifesté à mon égard la plus grande bienveillance. Je tiens à lui exprimer ma très profonde gratitude.

Je prie Messieurs les Professeurs F. Chapeville et R. Monier qui m'ont fait l 'honneur d'examiner ce mémoire, Monsieur le Professeur J.P. Ebel qui a permis la réalisation d'une partie de ce travail dans son laboratoire et a bien voulu accepter de siéger dans le jury, et Madame le Professeur M. Grunberg-Manago, qui a bien voulu assumer les fonctions de rapporteur, de trouver ici l'expression de ma respectueuse reconnaissance.

Je remercie Monsieur le Professeur J. Piéri de m'avoir orienté dans le dédale de la biologie moléculaire, et M.M. Yaniv d'avoir pris soin de guider mes premiers pas.

Une partie importante de ce mémoire a été réalisée grâce à la collaboration précieuse de Monsieur Expert-Bezançon et l'aide efficace de Madame Milet et de Mademoiselle Guérin. Je leur en suis très reconnaissant.

Je n'oublie pas non plus l'apport intellectuel qui m'a été fourni par les échanges de vue et les conseils de tous mes amis du laboratoire et de l'Institut, et c'est à Madame Lazcano que je dois la réalisation de ce mémoire. J'adresse à tous mes remerciements les plus vifs.

S O M M A I R E

page

Prologue 1

Introduction bibliographique 3

PREMIERE PARTIE

Synthèse de lysozyme avec des ribosomes 30S reconstitués Influence des méthodes de préparation des protéines 30S et de l'état conformationnel de l'ARN 16S sur l'activité des produits de reconstitution

Introduction 24

Chapitre I

Préparation d'ARN ribosomique dont la chaîne polynucléotidique est intacte et application de ces techniques à la préparation d'ARN messager actif pour la synthèse in vitro du lysozyme 25

I - Matériels et Méthodes

A) Bactéries, et bactériophages 26

B) Tampons, réactifs, produits chimiques 26

C) Extraction des ARN

1. Extraction par le phénol SDS à chaud 27
2. Extraction par la presse de French en présence de m-crésol 27
3. Sonication en présence de phénol 28
4. Méthode du lysozyme-phénol-SDS 28
5. Lysozyme et diéthylpyrocarbonate 29

D) Analyse sur gradient des ARN 29

1. Gradients analytiques
2. Gradients préparatifs

E) Test d'activité des différentes préparations d'ARN 30

II - Résultats

A) Rendements, composition, intégrité des molécules selon les diverses extractions 31

B) Activité in vitro des différents ARNm 34

III - Conclusion 35

Chapitre II

Reconstitution in vitro de sous-unités ribosomiques 30S à partir d'un ARN 16S préalablement dénaturé par chauffage et des protéines ribosomiques 30S. Etude de l'activité des ribosomes reconstitués pour la synthèse in vitro de lysozyme.

Introduction 37

I - Matériels et Méthodes 37

A) Tampons 37

B) Préparation des sous-unités ribosomiques 38

C) Préparation de protéines ribosomiques 38

D) Préparation et dénaturation de l'ARN 16S 39

E) Reconstitution de ribosomes 30S 40

F) Synthèse protéique in vitro 40

II - Résultats

A) Analyse sur gradients des ARN 16S chauffés 43

B) Reconstitution des particules 30S à partir d'ARN 16S natifs et dénaturés par chauffage 43

C) Activité des sous-unités ribosomiques 30S reconstituées 44

III - Conclusion 72

.../...

DEUXIEME PARTIE

Interactions ARN-protéines : localisation de protéines ribosomiques le long de la chaîne de l'ARN 16S

Introduction 51

Chapitre I

Etude d'un mode de dégradation Rnasique des sous-unités ribosomiques

Introduction 52

I - Mise en évidence de la dégradation de l'ARN ribosomique pendant l'incubation des sous-unités ribosomiques

A) Matériels et Méthodes 53

1. Tampon
2. Préparation des ribosomes marqués au ^{32}P 53
3. Analyse préliminaire sur gradient et gels de polyacrylamide de l'ARN ribosomique extrait des sous-unités purifiées 54

B) Résultats

1. Préparation de ribosomes 55
2. Etude analytique des ARN extraits des sous-unités ribosomiques après incubation 56

C) Conclusion 63

II - Exemples de cinétique de dégradation de l'ARN de sous-unités ribosomiques par autodigestion ; analyse par autoradiographie

A) Description de l'appareillage permettant une analyse rapide d'ARN ^{32}P électrophorésés sur gels de polyacrylamide 64

B) Etude par autoradiographie de la cinétique de dégradation de l'ARN après incubation de sous-unités ribosomiques 65

.../...

Chapitre II

Formation et caractérisation d'un complexe ARN-protéine

Introduction

I - Matériels et Méthodes 74

A) Purification de fragments de 16S

1. Préparation des plaques de gel 74
2. Etude de la pureté des bandes par électrophorèse 75
3. Elution de fragments d'ARN des gels 75

B) Etude par fingerprint de certains fragments d'ARN 76

C) Préparation de protéines ribosomiques marquées au ^{35}S et formation in vitro de complexes ARN-protéines 77

D) Electrophorèse sur gel d'acrylamide-diallyltartardiamide des complexes ARN-protéines 78

E) Caractérisation des protéines ribosomiques migrant avec un fragment d'ARN 16S 79

1. Extraction des protéines des complexes 79
2. Electrophorèse en deux dimensions des protéines ribosomiques 79

II - Résultats

A) Séparation sur plaque des fragments d'ARN 80

B) Contrôle de l'intégrité des fragments d'ARN par électrophorèse sur gel en plaque en présence d'urée 8 M 81

C) Etude des différentes techniques d'élution de fragments d'ARN dans les gels 81

D) Caractérisation par fingerprints de fragments d'ARN 16S 82

.../...

E) Etude analytique sur gel de polyacrylamide du fragment H"-M 92

F) Formation in vitro du complexe fragment H"-M et protéines ribosomiques 30S S^{35} 92

G) Séparation sur plaque en deux dimensions des protéines ribosomiques ayant interagi avec le fragment H"-M 97

III- Discussion 97

IV - Conclusion 100

TROISIEME PARTIE

Contribution à l'étude de la topologie des ribosomes par pontages entre protéines des sous-unités 30S ou 50S à l'aide de réactifs bifonctionnels bisimido-esters de différentes longueurs.

Introduction 103

I - Matériels et Méthodes

A) Préparation des sous-unités ribosomiques 104

B) Préparation de réactifs bifonctionnels 105

C) Préparation des protéines ribosomiques pour l'étude sur plaque en deux dimensions 106

D) Electrophorèse en deux dimensions

1. Construction de l'appareil 106
2. Conditions d'électrophorèse 107

E) Coloration et séchage des plaques 112

F) Autoradiographie 112

G) Comptage de la radioactivité 112

II -Résultats

A) Etude de la perte en protéines pendant les différentes étapes de l'électrophorèse sur plaques en deux dimensions 113

B) Détermination du nombre de copies de chaque protéine ribosomique présente dans nos préparations de ribosomes 50S 113

C) Pontage de ribosomes 118

Chapitre II

I - Matériels et Méthodes

A) Elution et récupération des complexes 129

B) Détermination des poids moléculaires de certains complexes par électrophorèse sur gel de polyacrylamide en présence de SDS 130

C) Destruction du pontage par ammonolyse 130

D) Analyse par électrophorèse en deux dimensions des produits d'ammonolyse 131

II - Résultats

A) Cinétique d'ammonolyse 131

B) Analyse de certains produits de pontage de la sous-unité ribosomique 30S par le DM subérimidate 132

C) Analyse des produits de pontage de la sous-unité ribosomique 50S par le DM subérimidate 143

III - Discussion

A) sous-unité 30S 148

B) sous-unité 50S 150

IV - Conclusion 152

BIBLIOGRAPHIE 155

P R O L O G U E

Les ribosomes sont des organites qui, en association avec différents facteurs solubles assurent la traduction des ARN messagers dans chaque cellule vivante. Un nombre considérable de travaux ont été entrepris sur la structure et le fonctionnement de ces particules dans le but de mieux comprendre les mécanismes précis de ce processus. Notre travail s'inscrit dans ce cadre. Nous nous sommes efforcés de préciser certains aspects de la structure du ribosome d'*Escherichia coli* afin de mieux localiser les sites d'interaction sur l'acide ribonucléique de certaines protéines ribosomiques, ainsi que l'emplacement de quelques protéines les unes par rapport aux autres.

Après avoir brièvement décrit une partie de l'état actuel de nos connaissances sur les ribosomes bactériens et précisé les études entreprises sur les interactions ARN-protéines et sur les voisinages protéine-protéine dans les ribosomes bactériens, nous présenterons nos résultats sous trois parties.

Dans une première partie, nous décrirons la reconstitution de la sous-unité ribosomique 30S à partir de l'ARN 16S dont la structure secondaire est, soit préservée, soit préalablement détruite par chauffage, et des protéines extraites de la sous-unité 30S. Nous montrons que les ribosomes reconstitués ont conservé tous les mécanis-

mes fins de la synthèse protéique (initiation, élongation, terminaison, et fidélité de lecture) illustrant ainsi la validité de l'étude de la structure et du fonctionnement du ribosome par les techniques *in vitro* de reconstitution.

Dans une seconde partie, nous décrirons nos études d'interactions ARN-protéines à partir de fragments d'ARN 16S, et de protéines 30S mettant en oeuvre un certain nombre de techniques de purification de fragments d'ARN et de complexes ARN-protéines. Une partie des sites de fixation de deux protéines des ribosomes a pu être localisée sur un petit fragment de l'ARN 16S.

Dans une troisième partie, nous présenterons les résultats d'une étude des voisinages des protéines ribosomiques, étude entreprise à l'aide de réactifs bifonctionnels dans les sous-unités 30S et 50S.

INTRODUCTION BIBLIOGRAPHIQUE

Les premières observations de ribosomes faites par Claude (1) dans des extraits de cellules animales et Luria (2) dans des extraits bactériens ont été suivies par des travaux de caractérisation physico-chimique de ces particules (3-5). Le début de l'étude biochimique du ribosome date cependant de l'établissement, notamment grâce aux travaux de Zamecnik, de Work, de Roberts, Britten et Bolton et leurs collaborateurs (6-10), du fait que cette particule est le site de la synthèse protéique et de la démonstration par Brenner, Jacob, et Meselson (11) que le ribosome ne contient pas l'information génétique nécessaire pour la synthèse protéique, mais fonctionne comme un appareil de traduction non spécifique de l'information contenue dans l'ARN messager. Bien que les travaux qui ont conduit à la reconnaissance du rôle du ribosome dans la synthèse protéique aient été réalisés en majeure partie avec des extraits de cellules animales, l'analyse détaillée de la composition, de la morphologie, de la structure et des fonctions du ribosome concerne principalement des particules bactériennes (*E.coli*).

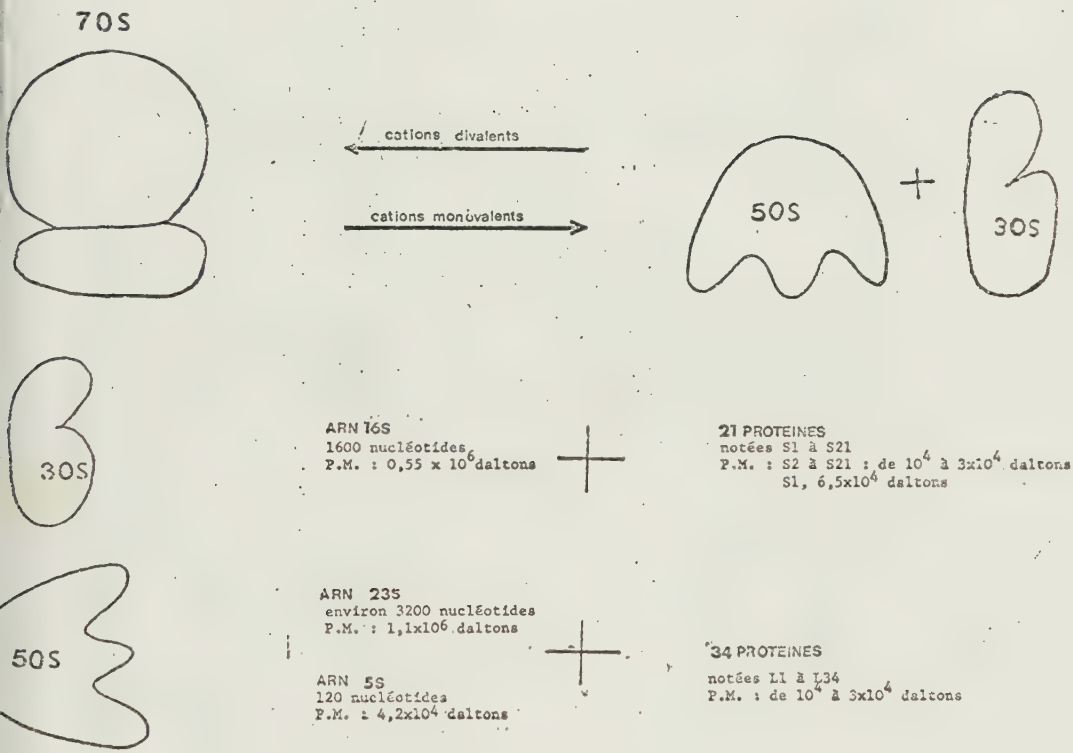
I - *CARACTERISTIQUES GENERALES DES RIBOSOMES BACTERIENS*

Les ribosomes sont des ribonucléoprotéines renfermant approximativement un tiers de protéines et deux tiers d'ARN en poids. L'unité fonctionnelle a un coefficient de sédimentation de 70S et est constituée de deux sous-unités : une petite et une grande, désignées d'après leurs coefficients de sédimentation, ribosomes 30S et ribosomes 50S. L'association de ces deux sous-unités est reversible et dépend de la teneur en cations mono- et divalents dans leur milieu de suspension (Mg^{++}, Ca^{++}, Mn^{++} ou Co^{++}). La concentration absolue en ions Mg^{++} ou Ca^{++} nécessaire pour maintenir l'association des deux sous-unités dépend à la fois de l'état fonctionnel du ribosome et de facteurs d'ordre physico-chimiques (12-27).

La microscopie électronique donne des ribosomes 70S et des sous-unités ribosomiques une image ressemblant aux dessins de la figure 1 (28-30). Leur taille varie selon les estimations de 75 x 100 x 200 A° à 100 x 130 x 145 A° (31) pour la sous-unité 30S ; de 138 x 164 x 164 à 166 x 186 x 186 A° (29) pour la sous-unité 50S et 150 x 150 x 190 A° à 170 x 230 x 250 A° pour le ribosome 70S (32, 33). La sous-unité 30S d'*E.coli* contient une seule chaîne continue d'ARN d'un poids moléculaire d'environ 560 000 (environ 1 600 nucléotides) et 21 protéines , tandis que la grande sous-unité contient deux chaînes continues d'ARN de poids moléculaire 42 000 et 1 100 000, et de longueurs 120 et environ 3 200 nucléotides respectivement (34-37) et 34 protéines. Ces résultats sont résumés dans le schéma de la figure 1. Les grands ARN du ribosome

d'*E.coli* désignés couramment par leurs coefficients de sédimentation (16S, 23S) contiennent chacun un petit nombre de bases puriques et pyrimidiques modifiées (méthylées). Le petit ARN de la grande sous-unité ne contient aucune base méthylée (38, 39). L'étude des séquences primaires des ARN 5S, 16S et 23S d'*E.coli* ne révèle aucune analogie entre les trois espèces (38-41, 86-96). Les ARN ribosomiques possèdent le même taux de structure ordonnée (double hélice) dans le ribosome intact et à l'état libre dans les milieux de force ionique moyenne (41-47). En parallèle avec ces recherches sur la structure du ribosome, d'autres travaux ont été effectués dans le but de préciser le rôle du ribosome dans la synthèse protéique. Les résultats accumulés dans ces études sont présentés dans la figure 2 qui illustre le mécanisme de la synthèse protéique. L'examen de l'ensemble des quelques résultats expérimentaux résumés ci-dessus montre que le ribosome est un organite très complexe formée par l'association d'un grand nombre de molécules différentes (protéines, ARN) et capable d'intèragir spécifiquement et de façon reversible avec de nombreuses autres molécules (ARNt chargés, facteurs d'initiation, d'élongation, et de termineison) au cours de la synthèse protéique. Cette complexité à la fois structurelle et fonctionnelle mesure la dimension des problèmes à résoudre dans l'étude de la structure et des fonctions du ribosome.

FIGURE I


70S
cations divalents
cations monovalents
50S
+
30S
30S
ARN 16S
1600 nucléotides
P.M. : 0,55 x 10^6 daltons
+
21 PROTEINES
notées S1 à S21
P.M. : S2 à S21 : de 10^4 à 3x10^4 daltons
S1, 6,5x10^4 daltons
50S
ARN 23S
environ 3200 nucléotides
P.M. : 1,1x10^6 daltons
ARN 5S
120 nucléotides
P.M. : 4,2x10^4 daltons
+
34 PROTEINES
notées L1 à L34
P.M. : de 10^4 à 3x10^4 daltons

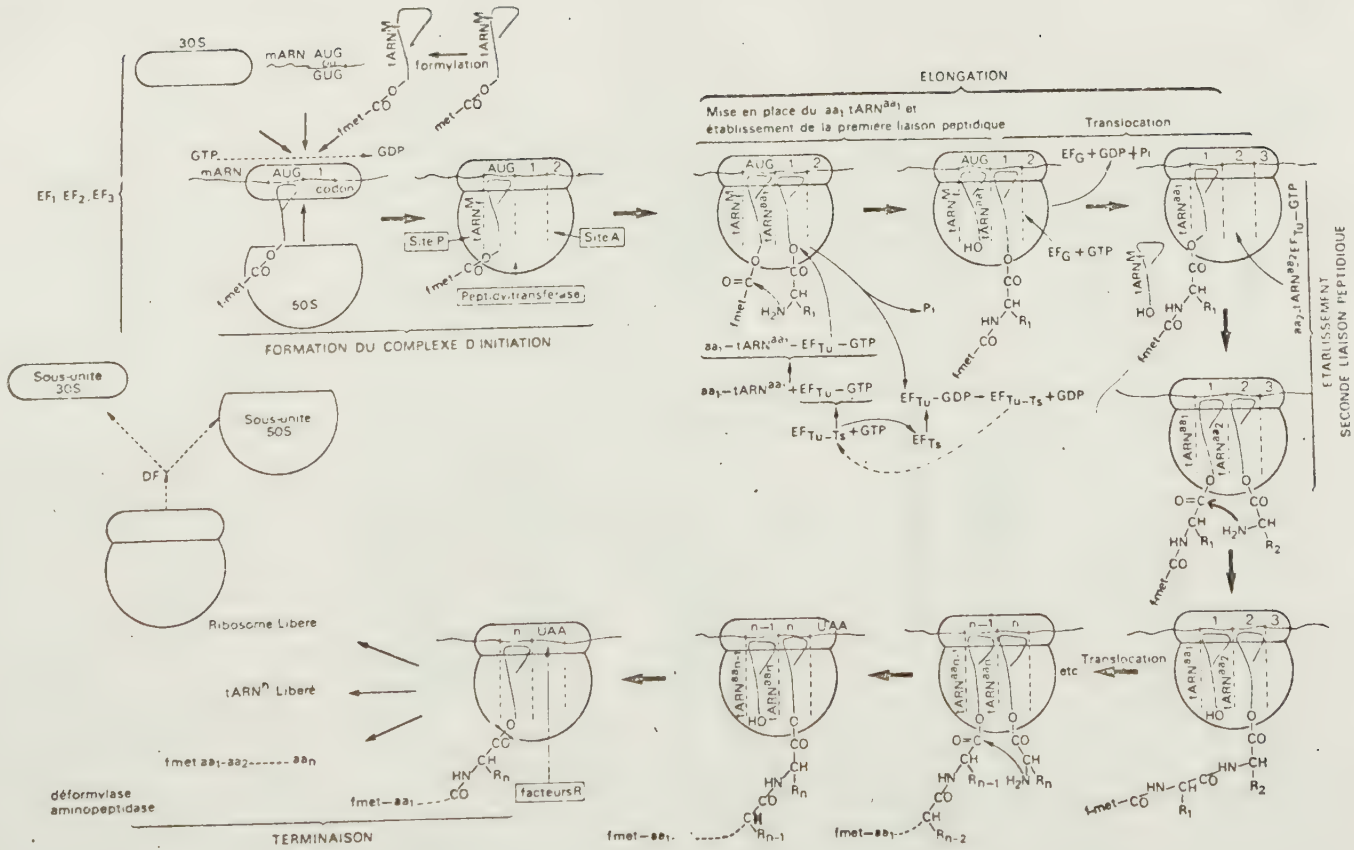


Schéma général récapitulatif des différentes étapes de la biosynthèse d'une chaîne polypeptidique

(figure 2)

II - STRUCTURE DES RIBOSOMES

A) ARN ribosomique

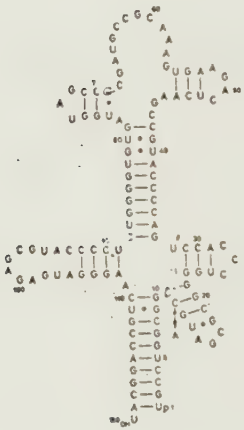
La séquence primaire des ARN 5S et 16S a été déterminée sur la souche MRE 600. Cette souche contiert plusieurs espèces de chacun de ces ARN, ces espèces correspondant à de très petites différences locales de séquence (38, 82-96). Les séquences primaires de ces deux ARN sont présentées dans les figures 3 et 4. Les études sur les structures secondaires et tertiaires ne permettent pas encore de présenter des résultats définitifs et il existe plusieurs possibilités d'appariement en double hélice de séquences de bases autocomplémentaires. Cependant, le pourcentage de double hélice estimé par des méthodes physico-chimiques est de l'ordre de 60 à 70% pour l'ARN 16S et correspond aux résultats déductibles à partir de la séquence primaire (44, 47, 97). L'analyse de la séquence primaire de l'ARN 23S est actuellement en cours (96).

B) Protéines

Le nombre total de protéines différentes des sous-unités 30S et 50S d'*E.coli* est respectivement de 21 et 34. L'introduction d'un procédé de séparation analytique des protéines ribosomiques par électrophorèse en deux dimensions (98) a permis d'établir une nomenclature rationnelle basée sur leurs propriétés électrophorétiques. Son emploi est à la base de la plupart des progrès récents ; les 21 protéines de la sous-unité 30S et les 34 protéines de la sous-unité 50S d'*E.coli*

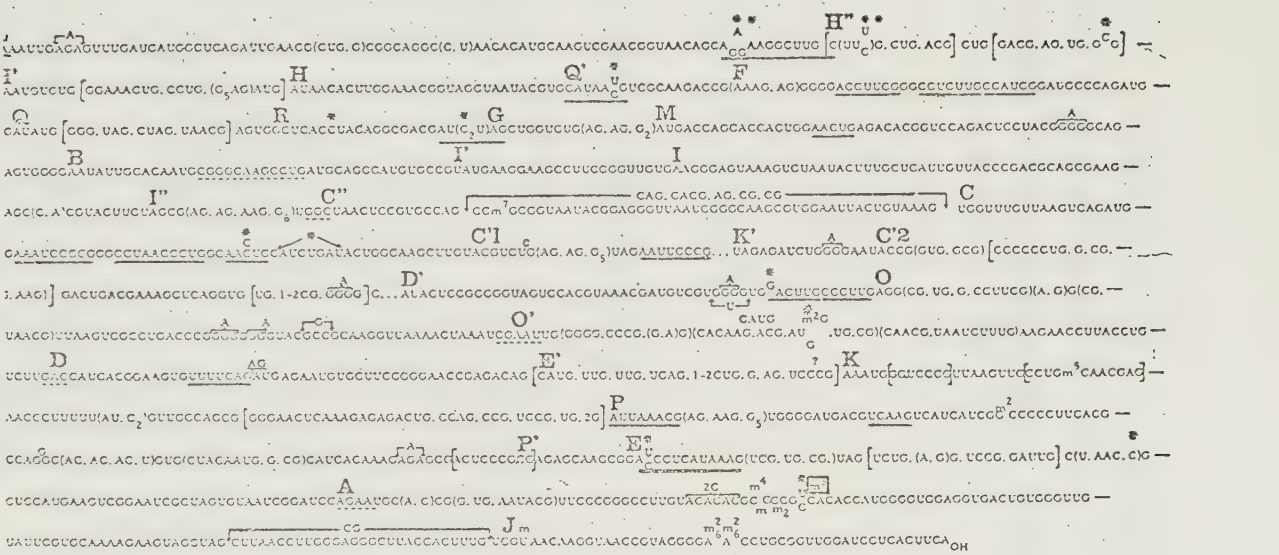
F I G U R E 3

Structure primaire de l'ARN 5S. Un modèle de structure secondaire propo



(référence 38)

FIGURE 4 : Structure primaire de l'ARN ribosomique 16S d'E.coli (96)



Les sections soulignées correspondent à des régions de séquences différentes dans l'ARN 16S du Proteus vulgaris

sont désignées S1 à ... S21 et L1 ... L34 (S = small, L = large). Les deux sous-unités ribosomiques d'*E.coli* sont hétérogènes en ce qui concerne leurs compléments protéiques. L'analyse quantitative des protéines de la sous-unité ribosomique 30S isolée et purifiée montre que celles-ci peuvent être divisées en trois groupes :

protéines unitaires	:	0,8-1,2 molécule par sous-unité 30S
protéines fractionnaires	:	moins de 0,6 molécule par sous-unité 30S
protéines intermédiaires	:	0,6-0,8 molécule par sous-unité 30S

Le même type d'analyse appliqué aux sous-unités 50S isolées et purifiées révèle la présence, en plus des protéines unitaires, fractionnaires et intermédiaires, de protéines présentes à raison de plus d'une copie par particule (protéines répétées). La signification de l'hétérogénéité ainsi mise en évidence n'est pas encore claire:
-s'agit-il d'un artefact des procédés d'isolement et purification (protéines fractionnaires et intermédiaires seulement), ou bien cette hétérogénéité correspond-elle à une hétérogénéité fonctionnelle des ribosomes ? On sait que le mécanisme de la synthèse protéique comporte plusieurs étapes distinctes (voir figure 2) et il semble possible que les ribosomes engagés dans ces différentes étapes puissent contenir des populations différentes de protéines, soit parce qu'il existe de façon permanente plusieurs types de ribosomes possédant des compositions et fonctions différentes, soit parce que le passage du ribosome d'une étape à l'autre au cours de la synthèse protéique est accompagné de la dissociation de certaines protéines (fractionnaires) et l'attachement d'autres.

A présent, la deuxième hypothèse semble la plus convaincante. Les travaux d'isolement et de caractérisation des protéines ribosomiques font le sujet de très nombreux mémoires dont les suivants sont les plus importants:

- nombre et caractéristiques chimiques et physico-chimiques, références 98-113
- stoichiométrie des protéines, références 99, 100, 105, 106, 114-120)
- séquence primaire des protéines, références 121-124

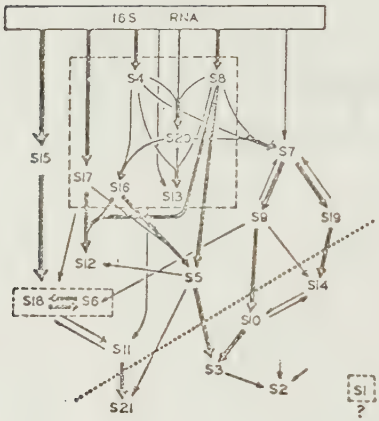
III - INTERACTIONS PROTEINES-ARN

A) Reconstitution in vitro de ribosomes 30S et 50S

La possibilité de reconstituer *in vitro* des sous-unités ribosomiques 30S fonctionnelles à partir de l'ARN 16S et de l'ensemble des protéines de la particule 30S a été découverte en 1968 (125). Le mécanisme de ce processus de reconstitution a été analysé en détail (126), et la technique de reconstitution exploitée pour étudier le rôle des différentes protéines dans l'assemblage du ribosome (reconstitution avec des mélanges incomplets de protéines, ou avec des mélanges contenant des protéines préparées à partir de ribosomes possédant des phénotypes différents.

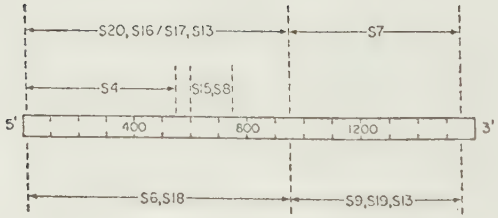
Ces travaux ont conduit à l'élaboration d'une carte d'assemblage du ribosome 30S (127, 128) (voir figure 5a) et à l'identification des protéines ribosomiques responsables de certaines caractéristiques du ribosome, par exemple, la résistance ou la sensibilité aux antibiotiques.

FIGURE 5



a

Carte de l'assemblage de la sous-unité 30S in vitro (128)



b

Localisation des sites d'interaction des protéines 30S sur l'ARN 16S (1

La reconstitution *in vitro* du ribosome 50S qui n'avait pu être réalisée que sur une bactérie thermophile *B. stearothermophilus* (131, 132) vient d'être réussie avec le ribosome 50S d'*E.coli* (133).

B) Localisation des sites d'interaction des protéines et de l'ARN

L'application de la technique de reconstitution *in vitro* des ribosomes a permis l'étude des interactions des ARN 16S et 23S et des protéines individuelles de ces deux sous-unités. Les protéines S4 S7 S8 S15 et S20 reconnaissent des sites spécifiques et indépendants dans l'ARN 16S (127, 134, 135) ; les protéines S4, S8, S15 et S20 interagissent avec des fragments situés du côté 5'-terminal de l'ARN 16S et la protéine S7 avec des fragments situés du côté 3'OH (136-140). La figure 5b résume les résultats obtenus dans ces études (139, 140) ; certains complexes ont pu être observés en microscopie électronique (141).

Par ailleurs, il semblerait, en ce qui concerne la sous-unité ribosomique 30S que la plupart des protéines possèdent un site d'interaction avec l'ARN 16S (149). Dans l'étude de la sous-unité 50S, les sites d'interaction des protéines L6, L8, L18, L25 et de l'ARN 5S ont pu être localisés avec précision (142-145). Les protéines L2, L16, L17, L19, L20, L33, L24 se fixent sur l'ARN 23S d'une manière spécifique et indépendante, mais nous n'avons que peu de précisions sur la localisation de ces sites (146-148).

IV - INTERACTIONS ET VOISINAGES ENTRE PROTEINES RIBOSOMIQUES

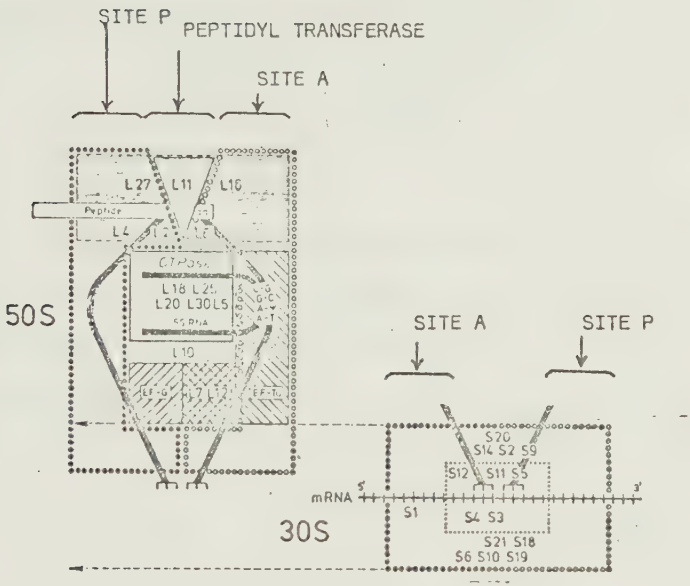
L'étude des interactions et des rapports de voisinage entre les protéines ribosomiques a été entreprise de diverses manières. Nous nous bornerons à énumérer quelques-unes des approches utilisées.

a) La reconstitution *in vitro* a permis d'observer des interdépendances entre protéines ribosomiques. Les résultats obtenus sont illustrés par des flèches dans la carte d'assemblage de la sous-unité 30S (figure 5a) et l'épaisseur des flèches reflète qualitativement la force de ces interdépendances.

b) L'étude des fonctions du ribosome a permis d'identifier parfois certaines protéines d'un même site fonctionnel grâce à des approches immunologiques, génétiques, physico-chimiques, biochimiques.
Des anticorps contre toutes les protéines de la sous-unité ribosomique 30S et contre plusieurs protéines de la sous-unité 50S d'*E.coli* MRE 600 ont été préparés et utilisés dans un grand nombre de travaux (150-159).
Les résultats de ces différents types d'études ont permis de proposer deux modèles résumant les connaissances actuelles sur la disposition fonctionnelle des protéines des sites actifs des sous-unités ribosomiques d'*E.coli* (160) (figure6).

c) Des digestions ménagées de l'ARN des sous-unités ribosomiques ont permis d'obtenir des fragments de ribosomes et les protéines de certains de ces fragments ont été identifiées (161-167).

FIGURE 6



SCHEMA DE LA DISPOSITION FONCTIONNELLE DES CONSTITUANTS DES SITES ACTIFS DES SOUS-UNITES RIBOSOMIQUES D'E.COLI (160)

∂∂	acide aminé
••••••	Site P
•••••••	Site A
	centre peptidyl transférase
	centre GTPase
	site d'attachement du facteur EF-G
	site d'attachement du facteur EF-Tu
	Groupe de protéines impliquées dans le contrôle de la fidélité de transcription
	ARNt ARN 5S

d) Des réactifs bifonctionnels ont été également utilisés. Dans certains cas, des protéines voisines ont pu être pontées et identifiées (168-178). Les résultats obtenus dans différents laboratoires et présentés en juin 1974 pour la sous-unité 30S sont résumés dans le tableau 7.

e) Une étude de l'architecture protéique des sous-unités ribosomiques a été entreprise au moyen d'anticorps purifiés. Ces travaux sont basés sur le fait que les ribosomes 30S ou 50S donnent des types d'images asymétriques en microscopie électronique et sur la nature divalente des anticorps. Leurs résultats, présentés dans la figure 8 (179-180) ont permis la localisation de certaines protéines.

Conclusion

Bien qu'un certain nombre de modèles de la structure de la sous-unité 30S aient été proposés (figure 8, 9a, et b), nous n'avons pas à l'heure actuelle suffisamment d'éléments pour connaître la structure et le fonctionnement précis de chaque constituant du ribosome. Des informations sur la forme et la structure des protéines, la localisation précise des sites d'interaction des protéines et de l'ARN, ainsi que le rôle des différents ARN et protéines sont encore nécessaires pour une meilleure compréhension du fonctionnement du ribosome.

Cette introduction bibliographique sera utilement complétée par la lecture d'un certain nombre de revues générales sur les ribosomes

- Masayasu Nomura : "bacterial ribosome" Bacteriological Reviews, septembre 1970, p. 228-277

. R.A. Garrett et H.G. Wittmann, Endeavour 1973 32 115

. Methods in Enzymology, volume XX part C section VII, 1971

volume XXX, part F, section IV, 1974

ou des revues sur des aspects particuliers du ribosome :

. A.S. Spirin : FEBS Letters, 1974, vol. 40, p. 538

(transformation structurelle du ribosome)

. N. Pace : Bacteriological Reviews, 1973, page 562

(biosynthèse des ribosomes)

et les références 72, 73, 80, 81, 180

30S :

Crosslinks obtenus par différents laboratoires

avec des bis Imido Esters d'après

EMBO Ribosome workshop (juin 74)

Elson Peretz	Traut Hershey	Lutter Kurland	Expert-Bezançon Barritault Hayes
S_7-$S_{9/11}$	S_5-S_8	S_5-S_8	S_5-S_8
S_5-S_8	S_2-S_3	S_{13}-S_{19}	S_7-S_9
S_4-S_5	S_{13}-S_{19}	S_7-S_9	S_4-S_5-S_8
S_4-S_5-S_3	S_5-S_9	S_{14}-S_{19}	S_8-S_{15}
$S_{12/13}$-$S_{18/19}$		S_{18}-S_{21}	S_7-S_{13}-S_{19}
			S_5-S_8-S_{15}
			S_4-S_5

FIGURE 7

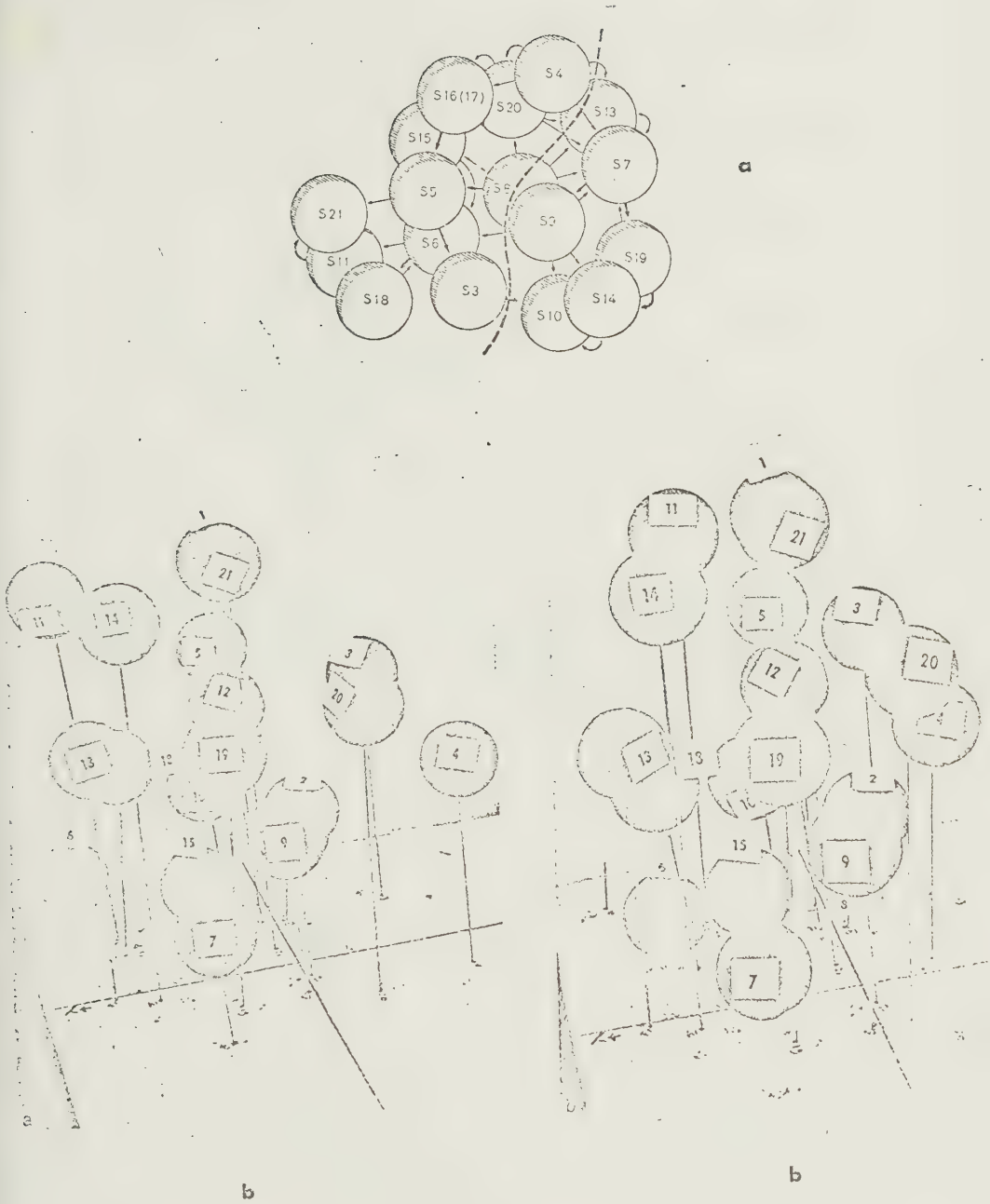
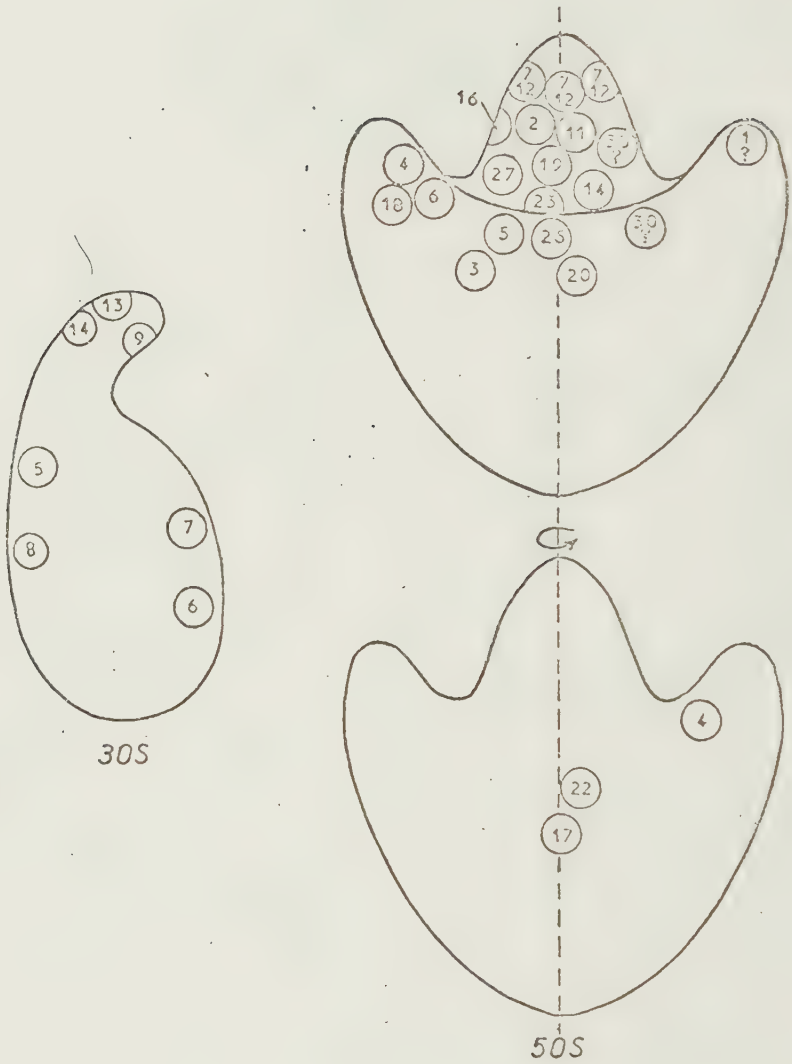


FIGURE 9 : Modèles proposés pour la structure de la sous-unité 30S

a) référence 163

b) référence 181

FIGURE 8



EMPLACEMENT DE CERTAINES PROTEINES DANS LES SOUS-UNITES RIBOSOMIQUES 30S ET 50S D'E.COLI (REFERENCE 180)

P R E M I E R E P A R T I E

SYNTHESE DE LYSOZYME AVEC DES RIBOSOMES 30S RECONSTITUES. INFLUENCE DES METHODES DE PREPARATION DES PROTEINES 30S ET DE L'ETAT CONFORMATIONNEL DE L'ARN 16S SUR L'ACTIVITE DES PRODUITS DE RECONSTITUTION

INTRODUCTION

Il a été montré que les sous-unités ribosomiques 30S, reconstituées *in vitro* sédimentaient à 30S et étaient actives pour l'incorporation d'acides aminés dans des chaînes polypeptidiques en utilisant comme ARN messagers des ARN de phages R_{17} ou MS_2 (125-126). Nous avons repris ces expériences, et montré que les sous-unités reconstituées étaient également capables de traduire l'ARN messager du lysozyme. Nous montrons donc que la reconstitution *in vitro* de sous-unités 30S préserve les mécanismes d'initiation, de terminaison et de fidélité de la traduction : le lysozyme synthétisé *in vitro* étant une protéine active. De plus, si l'ARN ribosomique 16S est préalablement dénaturé par chauffage, il est possible, en présence des protéines de la sous-unité ribosomique 30S et dans les conditions décrites pour la reconstitution, d'obtenir la formation de sous-unités 30S également actives dans la synthèse *in vitro* du lysozyme.

Comme nous le montrerons dans notre deuxième partie, l'ensemble de ces résultats constitue une étape nécessaire à notre approche de l'étude de la localisation des sites d'attachement des protéines sur l'ARN ribosomique.

C H A P I T R E I

Préparation d'ARN ribosomique dont la chaîne polynucléotidique est intacte et application de ces techniques pour la préparation d'ARN messager actif pour la synthèse in vitro *du lysozyme.*

INTRODUCTION

La purification d'ARN ribosomique dont la chaîne polynucléotidique ne comporte aucune coupure nécessite un soin particulier. La présence de nombreuses Rnases dans l'extrait cellulaire rend extrêmement difficile la purification des sous-unités ribosomiques dont les molécules d'ARN sont intactes. Dans les méthodes d'extraction que nous utilisons, les ARN sont purifiés directement à partir des extraits cellulaires.

I - MATERIELS ET METHODES

A) Bactéries et bactériophages

Les ARN ribosomiques sont extraits à partir de cellules d'*E.coli* MRE 600. La souche d'*E.coli* D10 (Rnase 1^-, Met^-) est utilisée pour la préparation de bactériophages T_4D (type sauvage) et comme cellule pour l'infection par T_4 pour la préparation d'ARN messager.

B) Tampons, réactifs, produits chimiques

1. Tris-HCl, 0,005 M, pH 7,4 ; Acétate de magnésium, 0,01 M ; chlorure d'ammonium, 0,05 M ; β-mercaptoéthanol, 0,006 M.
2. Acétate de sodium, 0,01 M, pH 4,5 ; chlorure de sodium, 0,1 M.
3. Tris-HCl, 0,005 M, pH 7,4 ; chlorure de sodium, 0,1 M.
4. 5% TCA-valine est une solution contenant 50 g d'acide trichloroacétique, et 100 mg de DL-valine par litre d'eau.

Les solutions 1-3 sont stérilisées. Le phénol et le métacrésol sont repurifiés par distillation sous vide en présence d'azote et gardés à 4°C sous azote dans l'obscurité. Le sodium-dodécyl-sulfate est recristallisé deux fois dans l'éthanol.

C) *Extraction des ARN*

Afin d'éviter les risques de contamination par des nucléases, nous avons utilisé de la vaisselle lavée à l'acide et stérilisé toutes nos solutions. Pour chacune des extractions que nous allons décrire, un culot de cellules congelées provenant de la centrifugation de 100 ml de cellules D10 infectées pendant 20 minutes par T_4 est décongelé à 0°C et les bactéries sont resuspendues dans 1,5 ml de tampon 1 (la concentration bactérienne est approximativement de 0,18 mg/ml).

1. - *Extraction par le phénol SDS à chaud*

Nous utilisons la méthode décrite par Salser et coll. (182-183). L'ARN est séché sous vide, redissous dans de l'eau distillée et stérile à 0°C, et la solution est clarifiée par centrifugation si nécessaire. La concentration d'ARN est ensuite ajustée à 10 mg/ml (240 OD_{260}/ml, et la solution gardée en échantillons de 100 µl à -70°C.

2. - *Extraction à la presse de French en présence de métacrésol*

On ajoute 1 volume de métacrésol saturé par du SDS à 1% à la suspension de cellules que l'on désintègre à la presse de French (à 0°C) réglée à 140 kg/cm^2 (une pression supérieure, 700-1 400 kg/cm^2, rend difficile une bonne déprotéinisation car les débris membranaires sont plus

nombreux) (184).

L'homogénat est centrifugé 20 minutes à 6 000 g et la phase aqueuse est prélevée et extraite une nouvelle fois avec un volume de m-crésol-SDS par agitation au vortex pendant 5 minutes. Après que l'on ait ajusté la concentration de chlorure de sodium à 0,1 M, la solution aqueuse finale est précipitée par l'addition de 2 volumes d'éthanol. Les acides nucléiques précipités après une heure à -20°C sont centrifugés 15 minutes à 6 000 g puis dissous dans 5 ml de tampon 2 et précipités à nouveau par addition de deux volumes d'éthanol, ceci est effectué deux fois de suite, et finalement, le culot est séché pour évaporer l'éthanol résiduel. L'ARN est traité ensuite d'après la méthode 1.

3. - Sonication en présence de phénol

A la suspension cellulaire nous ajoutons un volume de phénol saturé de tampon 2 et contenant 1% de SDS et l'ensemble est soumis aux ultra-sons pendant 2 minutes à 0°C, à l'aide d'un sonicateur MSE de 100 watts et d'une tête de section $7mm^2$ avec une amplitude pic à pic de 7µ. L'homogénat est traité comme dans la méthode 2.

4. - Méthode du lysozyme-phénol-SDS

Nous ajoutons du lysozyme de blanc d'oeuf (50 µg/ml) à la suspension cellulaire qui est laissée 30 minutes à 0°C puis congelée dans un bain d'acétone refroidi à l'aide de CO_2 solide. Après l'addition d'un volume de phénol saturé avec du tampon 2 et contenant 1% de SDS, ce mélange est décongelé en agitant à température ambiante au vortex, puis recongelé comme précédemment. L'opération est répétée trois fois, et l'homogénat final est centrifugé et traité comme dans

la méthode 2.

5. - Lysozyme et diéthyl-pyrocarbonate suivi de phénol SDS

Solymosy et coll. (186) utilisent le diéthyl-pyrocarbonate pour extraire de l'ARN non dégradé de tissus de plante. Nous ajoutons 0,1 ml de diéthyl-pyrocarbonate à une solution de cellules traitées au lysozyme et congelées comme dans la méthode 4. La suspension est décongélée, incubée 15 minutes à 37°C, puis recongelée. Un volume égal de phénol saturé avec du tampon 2 et contenant 1% de SDS est ajouté et l'ARN est extrait comme dans la méthode 4.

D) *Analyse sur gradient des ARN*

1. - Gradients analytiques

Des gradients de 5ml, 5-20% de sucrose, sont préparés dans le tampon 2, chargés avec des échantillons de 40 µg d'ARN dans 100 µl d'eau et centrifugés à 50 000 rpm maximum pendant 150 minutes à 0-4°C (rotor Spinco SW 50). Les gradients sont ensuite enregistrés en UV automatiquement (260 nm).

2.- Gradients préparatifs

Des gradients de 25 ml en 10-40 % de glycérol sont préparés dans le tampon 3 et chargés avec des échantillons contenant 3 mg d'ARN dissous dans 1 ml de tampon 3 puis centrifugés à 24 000 rpm maximum pendant 16 à 17 heures (rotor Spinco SW 25.1). L'absence de sucrose est nécessaire pour effectuer des tests colorimétriques de détection d'ADN

dans les fractions du gradient.

E) Test d'activité des différentes préparations d'ARN

L'activité des ARN messagers présents dans les ARN totaux extraits de cellules D10 infectées par T_4 est mesurée par leur capacité de synthétiser *in vitro* de la valine tritiée dans les chaînes polypeptidiques. La préparation des phages et cellules ainsi que les conditions de ces mesures sont celles décrites dans les références suivantes : (182, 183, 187, 188).

Pour mesurer la foramtion de lysozyme et l'incorporation d'acides aminés *in vitro* dans les chaînes polypeptidiques, nous ajoutons 0,15 à 0,25 µmole (6 µCi) ^{3}H valine à 100 µl de mélange réactionnel (reaction mixture, 187). Le mélange d'incubation (incubation mixture, 187) est placé dans un bain à 37°C après un prélévement de 25 µl à 0°C représentant le temps zéro d'incubation. Les échantillons de 25 µl sont ensuite prélevés toutes les 10 minutes, précipités par l'addition de 1 ml de TCA-valine 5% et après filtration sur membrane de nitrocellulose, la radioactivité est mesurée en scintillation liquide. Un autre échantillon de 75 µl est prélevé après 30 minutes pour la mesure de la quantité de lysozyme synthétisé. Pour chaque préparation d'ARN messager, on détermine par des essais préliminaires les conditions dans lesquelles la synthèse *in vitro* de protéines n'est limitée que par la quantité d'ARN messager présent. L'activité de l'ARN messager pour le lysozyme est exprimée en µg de lysozyme synthétisé pour un mg d'ARN messager en utilisant du lysozyme de blanc d'oeuf pour l'étalonnage.

II - RESULTATS

A) Rendement, composition, intégrité des molécules selon les diverses extractions

Quatre préparations d'*E.coli* infectées par T_4 sont étudiées dans le tableau I, les ARN ont été extraits selon les méthodes précédemment décrites. Comme il était prévisible, les méthodes douces de désintégration des cellules (traitement au lysozyme-SDS à 0°C) donnent un rendement en ARN extrait inférieur à celui obtenu par des méthodes plus violentes (presse de French, sonication ou SDS-phénol à chaud).

Les caractéristiques physiques de ces préparations d'ARN sont illustrées dans la figure 10. Dans tous les cas la composition en ARNt ARNr 16S, ARNr 23S est presque semblable. Les ARN 16S et 23S ne contiennent essentiellement qu'une chaîne polynucléotidique sans coupures internes (ces coupures internes seraient révélées par chauffage à 90°C pendant deux minutes en milieu de faible force ionique). Dans les préparations l'ARN obtenu par sonication et presse de French, on observe un produit sédimentant vers 12S (figure 10, gradients B et C).

Nous avons montré par dosage colorimétrique au diphénylamino-acide acétique (189) que cette fraction sédimentant vers 12S était de l'ADN.

Le profil F illustre une préparation d'ARN 16S ribosomique obtenu par traitement au phénol SDS de sous-unités 30S purifiées (c.f. page 58). Dans cet échantillon, la présence d'un nombre significatif de coupures cachées dans la chaîne polynucléotidique est révélée après dénaturation thermique de l'ARN.

TABLEAU I

MODE D'EXTRACTION	Expérience 1		Expérience 2		Expérience 3		Expérience 4		
	rendement en ARN (mg/ml)(1)	lysozyme synthétisé (µg/mg ARN)	rendement en ARN (mg/litre)	lysozyme synthétisé (µg/mg ARN)	rendement en ARN (mg/litre)	lysozyme synthétisé (µg/mg ARN)	rendement en ARN (mg/litre)	lysozyme synthétisé (µ g/mg ARN)	synthèse totale de protéines (incorp. de 3H valine par mg d'ARN (cpmx10-3)
SDS/phénol 64°C	---	---	18,7	11	23,0	7	15,3	8,3	47,5
Presse de French sur m-crésol	13	1,6	17,3	29/37 (2)	21,4	8,5	23,6	10,9	87,0
sonication en présence de phénol	17,9	1,2	—	—	25,6	10,4	18,1	10,9	55,4
lysozyme-phénol SDS (3)	8,9	0,6	---	---	18,5	10,9	11,3	10,9	97,4
lysozyme-DEPC-phénol-SDS (3)	9,8	0,6	—	—	22,1	7	23,3	6,7	46,6

Tableau I - Rendement et contenu en ARN_m des différentes préparations d'ARN
Les rendements et les activités des ARN_m messagers préparés par les 5 procédés d'extraction à partir de plusieurs cultures différentes d'*E.coli* sont comparés. 12 litres de culture d'*E.coli* D10 sont cultivés et infectés. Les activités de l'ARN_m total et du lysozyme sont mesurées dans chaque type d'extraction.
Les expériences 1,3, 4 : les extractions sont faites à partir de 2 litres de culture de cellules infectées.
expérience 2 : les extractions sont faites à partir de 6 litres de culture de cellules infectées.

---

(1) rendement en ARN exprimé en mg/litre de culture bactérienne (avant l'addition de T_4 et du tryptophane)
(2) deux mesures indépendantes d'activité du lysozyme
(3) des expériences de contrôle ont permis de vérifier que l'ARN extrait selon ces méthodes ne contient pas de lysozyme contaminant

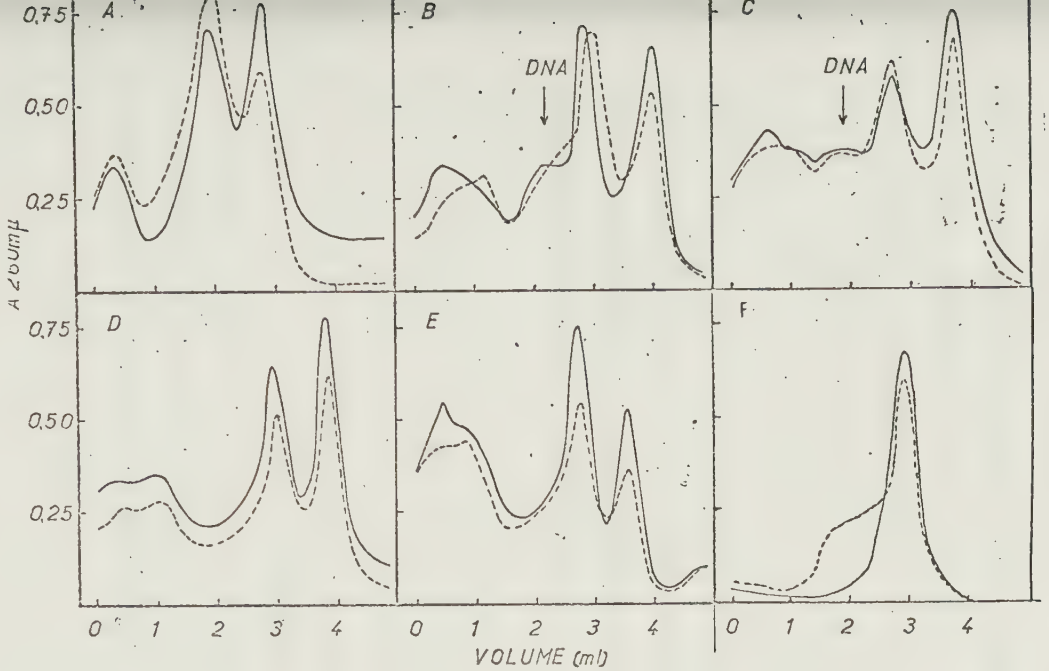


Figure 10 - Analyse sur gradient de sucrose de la sédimentation des ARN extraits après infection de cellules d'*E.Coli* D10 par le bactériophage T4 et d'un ARN 16S extrait du ribosome 30S. Profils avant et après chauffage.

Les solutions d'ARN à la concentration de 400 µg/ml dans de l'eau distillée et obtenues selon les 5 méthodes d'extraction testées dans le tableau I sont analysées par centrifugation. Des échantillons de 100 µl sont chauffés 2 minutes à 90°C et refroidis rapidement. Les échantillons, chauffés et non chauffés, sont centrifugés sur gradient de sucrose comme il est décrit dans le mode opératoire. Les profils obtenus pour chaque préparation d'ARN avant et après chauffage sont présentés dans un même dessin.

Procédé d'extraction : A, SDS-phénol 64°C ; B, presse de French, m-crésol ; C, sonication en présence de phénol ; D, lysozyme-phénol-SDS ; E, lysozyme DEPC-phénol-SDS ; F, extraction au phénol-SDS à partir de sous-unités 30S purifiées. (c.f. : page)
Source d'ARN : A, expérience 4, tableau I
B, C, D, E , expérience 1, tableau I
——— ARN non chauffé
---- ARN chauffé (la sédimentation a lieu de gauche à droite)

B) *Activité* in vitro *des différents* ARN_m

Le tableau I résume l'ensemble de nos résultats : toutes les préparations fournissent des ARN messagers actifs, les méthodes de désintégration violentes produisent des ARN messagers à haute activité spécifique. L'utilisation du diéthylpyrocarbonate ne semble pas permettre une amélioration de la protection contre les dégradations ribonucléasiques par rapport à ce que nous avons obtenu dans les autres extractions. On peut également noter la grande variation des activités spécifiques des échantillons d'ARN extraits selon le même procédé mais provenant de différentes préparations de cellules infectées (synthèse du lysozyme dans les préparations au m-crésol-presse de French). Deux explications peuvent être avancées pour essayer d'expliquer ces variations.

1) la cinétique de production d'ARNm de lysozyme est peut-être différente d'une préparation à l'autre. Les ARNm sont extraits de cultures récoltées après 20 minutes d'infection, et une faible erreur sur la mesure de temps d'infection se traduit par de fortes variations de quantités d'ARNm de lysozyme synthétisé.

2) Il existe de grandes variations dans les quantités de lysozyme synthétisé pour une préparation donnée d'ARNm selon les S30 utilisés (190). Dans l'expérience 1, le S30 était différent de celui utilisé dans les expériences 2, 3, 4.

CONCLUSION

Les différentes méthodes d'extraction décrites dans cette étude semblent satisfaisantes pour la préparation d'ARN ribosomique intact, cependant, les profils avant chauffage de l'ARN total obtenu par sonication en présence de phénol ou par lysozyme-phénol-SDS montrent un rapport des densités optiques de 23S/16S plus proche de 2 que celui obtenu par les autres méthodes. Ce sont ces deux procédés que nous avons finalement choisis, évitant ainsi le risque de purifier avec l'ARN 16S des fragments d'ARN 23S sédimentant également à 16S (191). Les techniques d'extraction par le phénol chaud ou presse de French-métacrésol sont utilisées pour nos préparations d'ARN messager.

C H A P I T R E II

Reconstitution in vitro *de sous-unités ribosomiques 30S à partir d'ARN 16S préalablement dénaturé par chauffage, et de protéines ribosomiques 30S - Etude de l'activité des ribosomes reconstitués pour la synthèse* in vitro *de lysozyme.*

INTRODUCTION

Les ribosomes 30S sont reconstitués à partir d'ARN 16S et de protéines ribosomiques 30S dans les conditions décrites par Traub et Nomura (126). La dénaturation préalable par chauffage d'un ARN 16S ne semble pas modifier la spécificité des interactions avec les protéines puisque des ribosomes 30S ont pu être reconstitués. Par ailleurs, nous montrons que les sous-unités 30S ainsi reconstituées sont non seulement capables de diriger l'incorporation d'acides aminés dans des chaînes polypeptidiques (192), mais également de synthétiser *in vitro* du lysozyme. Ces expériences illustrent la précision des mécanismes d'assemblage dans la reconstitution *in vitro* des sous-unités ribosomiques 30S ainsi que ceux de la renaturation de l'ARN 16S. Un travail analogue a été réalisé parallèlement et indépendamment, dans lequel la protéine synthétisée *in vitro* est l'hydrolase de la S-adénosyl méthionine (243).

I -MATERIELS ET METHODES

A) Tampons

1) Tris-HCl, 0,01 M, pH 7,4 ; Acétate de magnésium, 0,01 M ; chlorure d'ammonium, 0,06 M ; chlorure de sodium, 0,4 M ; β-mercaptoéthanol, 0,006 M.

2) Tris-HCl, 0,01 M, pH 7,4 ; Acétate de magnésium, 0,01 M ; chlorure d'ammonium, 0,06 M ; β-mercaptoéthanol, 0,006 M.

3) phosphate de potassium, 0,005 M, pH 7,8 ; urée, 6M, β-mercaptoéthanol 0,006 M.

4) phosphate de potassium, 0,005 M, pH 7,8 ; chlorure de potassium, 1 M β-mercaptoéthanol, 0,006 M ; acétate de magnésium, 0,01 M

5) Tris-HCl, 0,0001 M, pH 7,4

B) Préparation des sous-unités ribosomiques

La sous-unité ribosomique 30S est préparée à partir de cellules d'*E.coli* MRE 600 congelées. La suspension de particules 70S à 240 OD_{260} par ml dans le tampon 1 est précipitée par l'acide acétique et les sous-unités ribosomiques 30S partiellement purifiées par cette précipitation acide sont séparées par centrifugation en rotor zonal sur gradient 7-25% de sucrose. La sous-unité ribosomique 30S recueillie dans des fractions du gradient est précipitée par du polyéthylène glycol, redissoute dans le tampon 2 à une concentration de 10 à 20 mg par ml, et gardée à -70°C. La sous-unité 50S est préparée de façon semblable. Ce type de préparation est décrit plus en détail dans la référence 187.

C) Préparation de protéines ribosomiques

Les protéines sont extraites de sous-unités ribosomiques 30S,

a) par le traitement au chlorure de lithium-urée, puis dialysées contre le tampon 4 (126)

b) par l'acide acétique en présence de 0,1 M de chlorure de magnésium (193-194). Les protéines sont ensuite dialysées contre le tampon 3 puis contre le tampon 4. Les solutions de protéines ainsi obtenues sont utilisées immédiatement pour la reconstitution, ou gardées peu de temps (moins de un mois) à -20°C.

c) Plus récemment, pour nos études de séparation de protéines ribosomiques par électrophorèse en deux dimensions, (c.f. : 3e partie) nous avons eu à concentrer nos préparations de protéines ribosomiques. Le surnageant acide acétique, obtenu après extraction des protéines ribosomiques et centrifugation de l'ARN est précipité par addition de 5 volumes d'acétone. Une floculation immédiate des protéines a lieu et après centrifugation de 5 minutes à 1 500 g, et lavage du culot à l'acétone, les protéines sont redissoutes dans le tampon 3, puis dialysées contre le tampon 4.

D) *Préparation et dénaturation de l'ARN 16S*

L'ARN 16S est préparé par centrifugation d'ARN total extrait des cellules par le traitement du lysozyme-phénol-SDS (c.f. page 28). Des échantillons de $2400_{260\ nm}$ d'ARN dans le tampon 5 sont chauffés deux minutes à 90°C puis refroidis rapidement à la température ambiante pendant une demi-heure puis mis à 0°C. Les préparations d'ARN dénaturé sont utilisées immédiatement dans les expériences de reconstitution, un échantillon est prélevé et étudié en gradient analytique(2 DO à 260 nm).

E) Reconstitution de ribosomes 30S

Les reconstitutions *in vitro* sont obtenues par incubation d'un mélange de 22 DO à 260 nm d'ARN ribosomique 16S et 1,2 équivalent de protéines ribosomiques 30S dans les conditions décrites par Traub et Nomura (126). Après incubation, un aliquot du mélange de reconstitution contenant 2 $DO_{260\ nm}$ d'ARN est analysé par centrifugation sur gradient de sucrose. Le reste du mélange est précipité au polyéthylène-glycol (10%) puis centrifugé dans les conditions décrites pour la préparation des sous-unités ribosomiques (187). Le culot ainsi obtenu est redissous dans le tampon 2. La solution est ensuite centrifugée 5 minutes à 10 000 g pour éliminer les produits non solubilisés et la concentration est ajustée à 90 DO par ml à 260 nm. Les échantillons sont gardés à -70°C.

F) Synthèse protéique in vitro

Les conditions utilisées sont celles décrites dans le chapitre I. Nous utilisons un S150 préparé selon (187), et nous testons les ribosomes reconstitués en présence d'une quantité équivalente de ribosomes 50S (1 DO de ribosome reconstitué pour 2 DO de 50S). La synthèse du lysozyme est étudiée dans les conditions où la quantité de ribosomes 30S est limitante. Les activités mesurées sont exprimées en équivalents de µg de lysozyme de blanc d'oeuf synthétisé par mg de ribosomes 30S normaux ou reconstitués. L'incorporation d'acides aminés *in vitro* dans les chaînes polypeptidiques est également mesurée avec de la ^{3}H-valine.

FIGURE 11

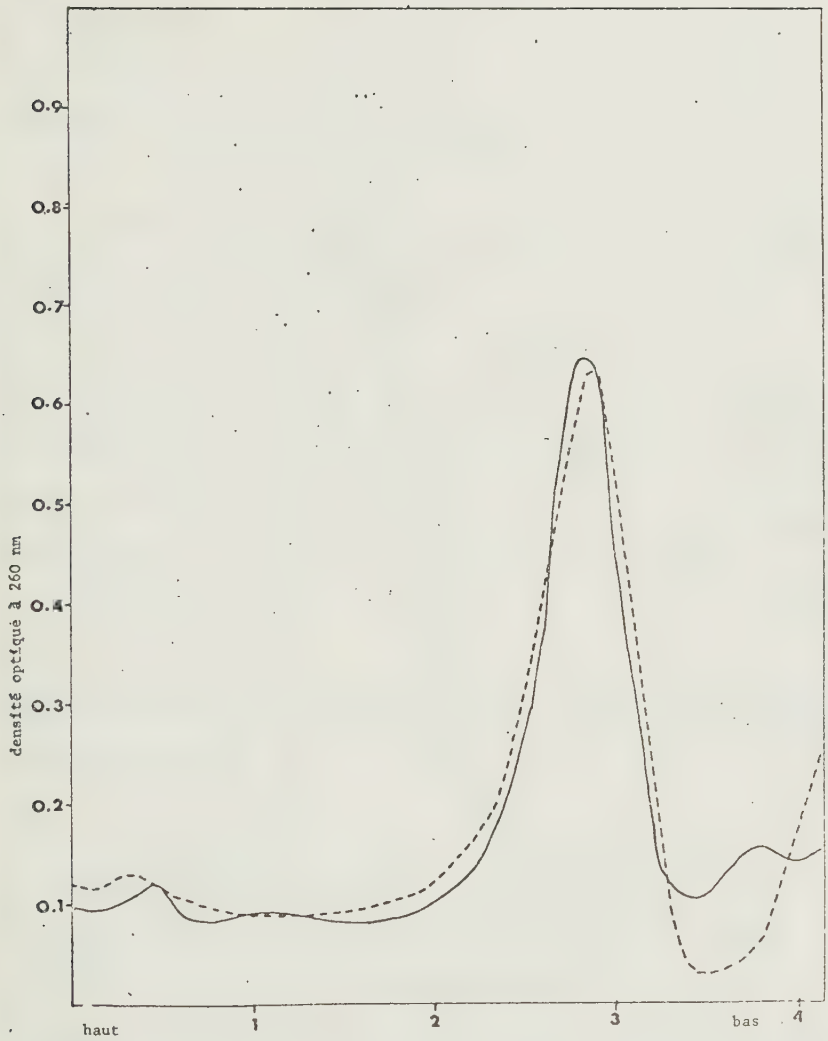


Figure 11 - Gradient analytique d'ARN 16S extrait à partir de sous-unités 30S séparées en 10^{-2} $MgCl_2$, 0,4 M NaCl et déprotéinisées par extraction de protéines par l'acide acétique et traitement au phénol-SDS

—— non chauffé

--- chauffé

centrifugation (c.f. page 29)

FIGURE 12

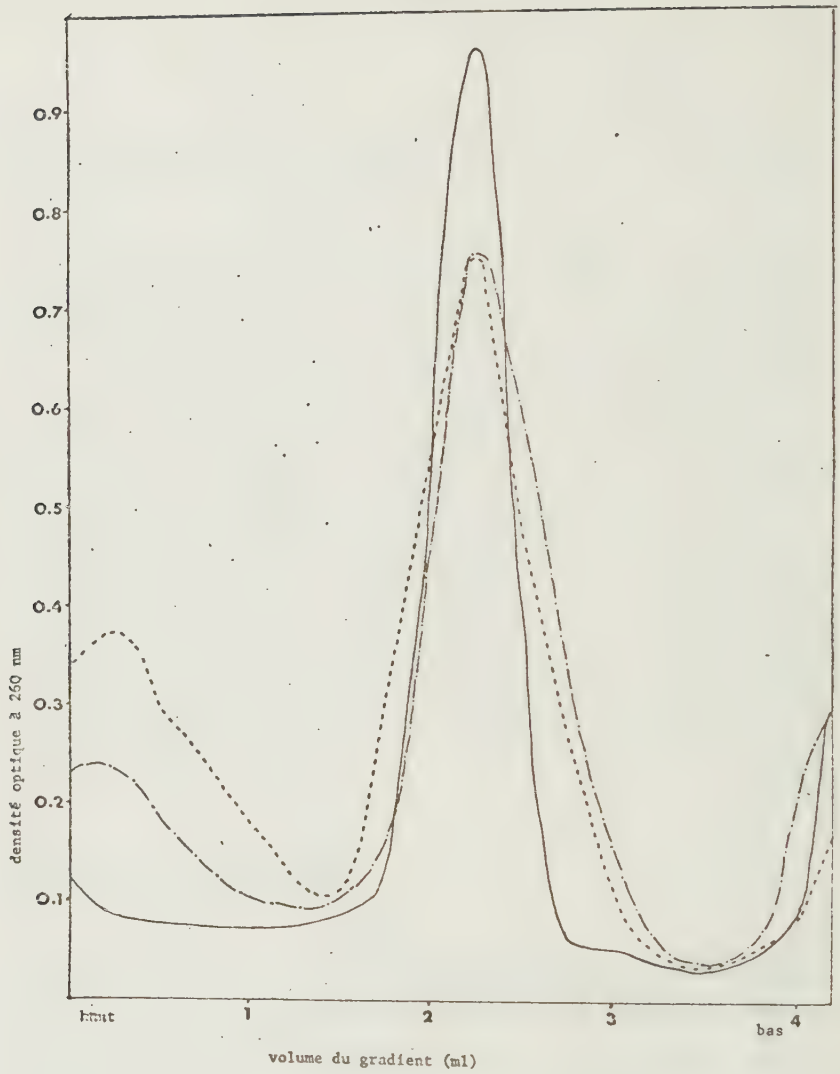


Figure 12 - Profil de centrifugation de sous-unités ribosomiques 30S centrifugation dans un rotor SW 25.1, dans les gradients de 4ml, 5-20% sucrose dans le tampon 2, en utilisant les adaptateurs trois places (195).

——— ribosomes 30S

—.—. ribosomes 30S reconstitués à partir de protéines extraites au LiCl-urée ou à l'acide acétique 66%, l'extraction étant suivie d'une précipitation à l'acétone

---- ribosomes 30S reconstitués à partir d'un ARN 16S préalablement dénaturé par chauffage

II - RESULTATS

A) Analyse sur gradient des ARN 16S chauffés

Les profils de sédimentation d'un ARN 16S natif et dénaturé sont dessinés dans la figure 11. On constate que dans cette préparation la molécule ne contient pas de coupures cachées puisque après dénaturation on obtient une molécule intacte, sédimentant comme la molécule native. Une différence de comportement des deux molécules en chromatographie sur colonne de MAK (méthyl-albumine-kieselguhr) a été rapportée (192) et interprétée comme une illustration d'un changement des structures secondaires et tertiaires de la molécule obtenue pendant la dénaturation thermique de l'ARN.

B) Reconstitution de particules 30S à partir d'ARN 16S natifs et dénaturés par chauffage

Les gradients de la figure 12 représentent les profils de sédimentation des produits de reconstitution obtenus à partir d'ARN 16S natifs ou dénaturés et de protéines ribosomiques extraites selon les différentes méthodes décrites précédemment. Tous les produits de reconstitution sédimentent à 30S et les profils de sédimentation sont comparables. On note cependant un élargissement des bases des pics correspondant aux ribosomes reconstitués.

C) *Activité des sous-unités ribosomiques 30S reconstituées pour la synthèse* in vitro *du lysozyme et l'incorporation d'acides aminés*

L'activité du lysozyme est mesurée par turbidimétrie (187), après un étalonnage du système avec des quantités connues de lysozyme de blanc d'oeuf (figure 13a). Nous comparons les différentes préparations de ribosomes 30S reconstitués en mesurant l'activité du lysozyme synthétisé *in vitro*. Les pentes obtenues avec différents ribosomes 30S reconstitués sont représentées dans la figure 13b, et comparées à celles obtenues avec les ribosomes 30S de départ. Les ribosomes reconstitués avec un ARN 16S préalablement dénaturé par chauffage ont une activité de synthèse *in vitro* de lysozyme légèrement inférieure (60% de l'activité des ribosomes 30S de départ) mais la précision des mesures n'est pas suffisante pour que l'on puisse être certain que cette différence soit significative.

Les mesures d'incorporation *in vitro* de la ^{3}H-valine sont illustrées dans la figure 14. Les trois préparations de ribosomes reconstitués montrent des valeurs très voisines et l'on obtient une activité d'environ 60% de celle mesurée pour des ribosomes 30S de départ. Le chauffage de l'ARN ne semble pas avoir modifié les propriétés des ribosomes reconstitués.

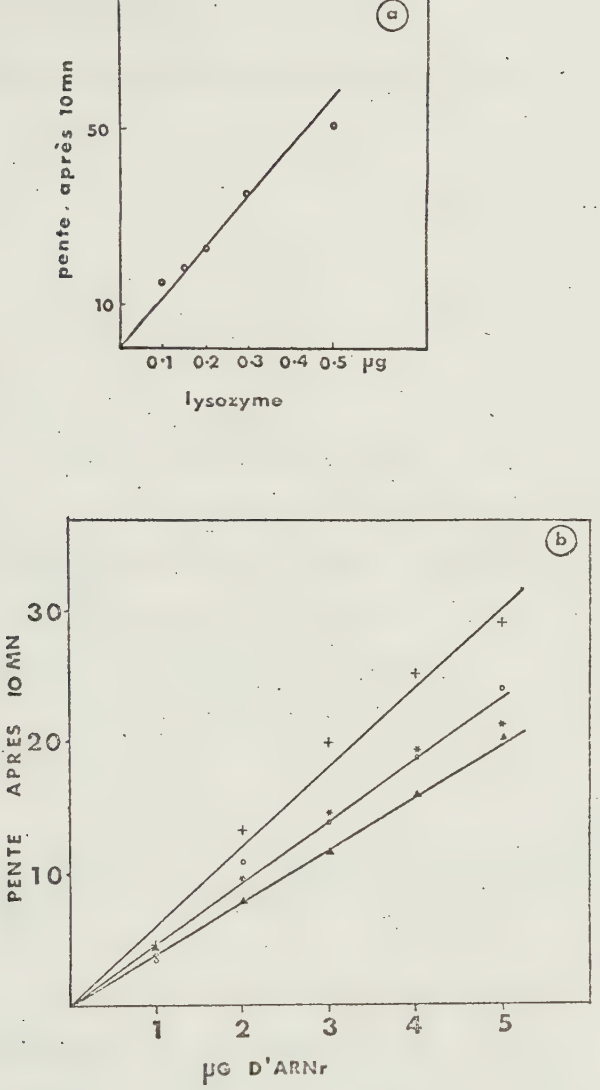


Figure 13 - La décroissance de l'absoption à 450 nm du substrat du lysozyme est enregistrée pour chaque échantillon et la pente de cette décroissance est mesurée après 10 minutes. Cette pente est reportée en ordonnée, en fonction :

a) de quantités connues de lysozyme : courbe d'étalonnage

b) de la quantité d'ARNr utilisée pour la synthèse *in vitro* du lysozyme

Les systèmes suivants ont été testés :

+ + 30S origine + 50S origine

✱ ✱ 30S reconstitués (LiCl+urée) + 50S origine

o o 30S reconstitués (ac. acétique + acétone) + 50S origine

Δ Δ 30S reconstitués (ac. acétique+acétone+ARN 16S chauffé) + 50S origine

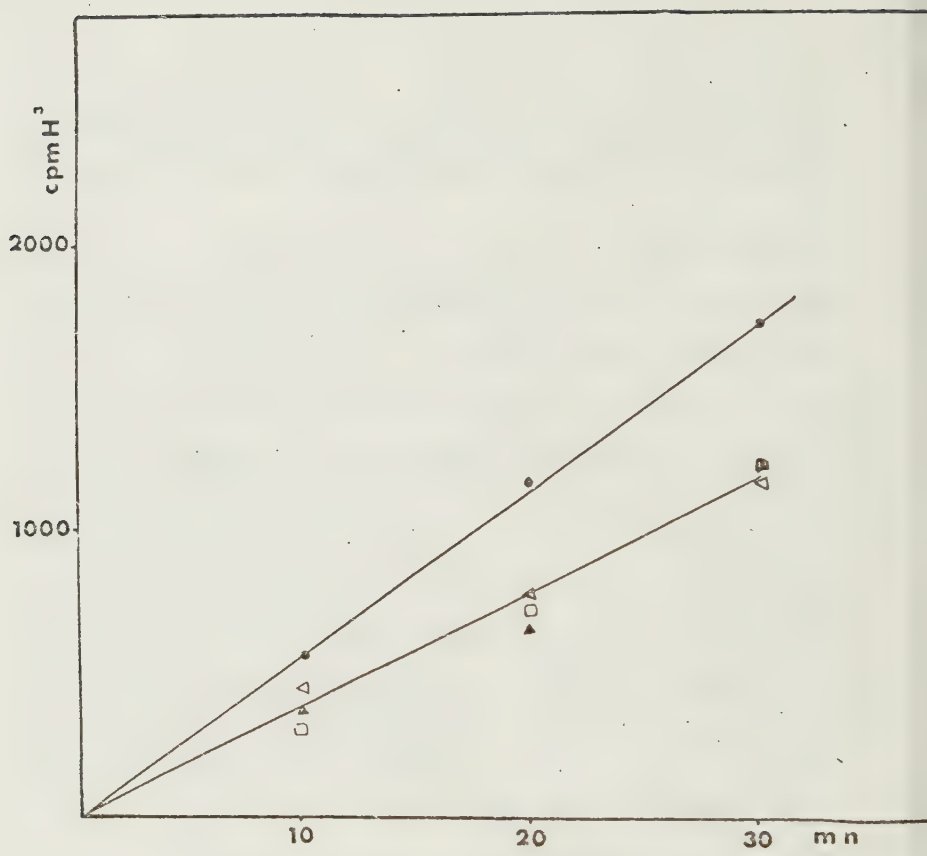


FIGURE 14 - Incorporation *in vitro* de la ^{3}H-valine

après différents temps d'incubation du mélange (c.f; page 3

• • • 30S origine + 50S origine

□ □ 30S reconstituée (LiCl-urée) + 50S Origine

△ △ 30S reconstitués (A.acétique+acétone) + 50S origi

▲ ▲ 30S reconstitués (a. acétique + acétone, et ARN 1

chauffé) + 50S origine

CONCLUSION

Bien que de nombreux travaux sur la reconstitution des ribosomes aient été entrepris, il n'avait jamais été montré que des ribosomes reconstitués étaient capables de se comporter comme des ribosomes normaux dans toutes les phases de la synthèse protéique, notamment lors de l'initiation et de la terminaison. Il semble également qu'une dénaturation thermique de l'ARN 16S ne modifie pas d'une manière importante les propriétés de ces particules reconstituées bien qu'un chauffage de 2 minutes à 90°C en milieu de faible force ionique soit suffisant pour detruire les structures secondaires du type Watson-Crick (on ne peut cependant être certain d'obtenir une pelote statistique ; 196). La renaturation d'une molécule aussi structurée (197) et d'une longueur de 1600 nucléotides implique l'existence de très nombreuses régions d'autocomplémentarité comme celles proposées à partir des études de la séquence de l'ARN 16S (96). Il semble raisonnable de penser que la restructuration de la molécule de 16S a lieu principalement lors du refroidissement. L'incubation pendant la reconstitution permet à la molécule d'ARN de retrouver entièrement sa structure d'origine dans le ribosome. Cependant, les types d'interactions qui doivent exister dans la molécule 16S, au niveau de la structure tertiaire ne sont pas connus, mais il n'est pas exclu qu'elles soient aussi complexes que celles qui viennent d'être découvertes dans la structure de l'ARN de transfert (198, 199).

D E U X I E M E P A R T I E

INTERACTIONS ARN-PROTEINES : LOCALISATION DE PROTEINES RIBOSOMIQUES LE LONG DE LA CHAINE DE L'ARN 16S

INTRODUCTION

Les interactions ARN-protéines dans les ribosomes ont été étudiées à partir de complexes formés *in vitro* entre la molécule entière de l'ARN 16S et une ou plusieurs protéines ribosomiques purifiées de la sous-unité 30S. Des complexes spécifiques ont pu être isolés et après une dégradation de l'ARN par traitement à la Rnase T1 ou pancréatique, des morceaux d'ARN, protégés contre cette dégradation par les protéines du complexe, ont été caractérisés par fingerprint et localisés dans la molécule d'ARN 16S (134-140). Certains de ces complexes ont été dissociés et reformés *in vitro*, illustrant ainsi l'interaction spécifique des protéines et des fragments d'ARN (136, 139, 140).

Ces approches ont permis d'identifier les protéines ribosomiques interagissant directement avec l'ARN en formant un complexe spécifique dans des conditions de force ionique suffisante, et de poursuivre les études sur la stoichiométrie et la formation de ces complexes. Certains fragments d'ARN contenant un ou plusieurs sites de fixation de protéines ont été caractérisés, cependant, il s'agit souvent de gros fragments d'ARN (139, 140). Nous nous sommes efforcés d'isoler et de caractériser des fragments d'ARN d'assez petite taille et qui, après addition de l'ensemble des protéines ribosomiques 30S forment un complexe spécifique ARN-protéine(s) dans les conditions de reconstitution : la ou les protéine(s) fixée(s) sur ces fragments d'ARN peuvent alors être identifiée(s) après que ce complexe ait été

séparé de l'ensemble des protéines ribosomiques non fixées. Par ailleurs, il nous semble important que ces fragments d'ARN aient une chaîne polynucléotidique intacte afin de préserver toute la structure nécessaire à la reconnaissance du site d'interaction avec la protéine ; en effet, dans les autres études mentionnées (136, 139, 140), les fragments d'ARN ne sont pas intacts. Les résultats décrits dans la première partie nous permettent de conclure que la spécificité des interactions protéines-ARN dans la sous-unité ribosomique 30S est préservée après une dénaturation thermique préalable de l'ARN. Il semble alors possible d'isoler après chauffage des fragments d'ARN dont la chaîne polynucléotidique intacte contienne un ou plusieurs sites de fixation des protéines

C H A P I T R E I

Etude d'un mode de dégradation Rnasique des sous-unités ribosomiques

INTRODUCTION

Les molécules de l'ARN 16S extraites de sous-unités ribosomiq 30S après dissociation des ribosomes 70S en bas magnésium contiennent quartité variable de coupures internes. Nous attribuons cette dégradat de l'ARN à une ou plusieurs Rnases, fixées sur le ribosome lors de sa rification ou présentes *in vivo* dans les sous-unités ribosomiques. L pourcentage de molécules dégradées varie selon les préparations et sel l'âge des ribosomes (dans notre première partie, cette observation nou avait conduits à l'étude de diverses méthodes d'extraction d'ARN 16S intacts à partir d'ARN totaux et non à partir de ribosomes 30S).

Nous avons entrepris d'étudier cette digestion de l'ARN ribo somique dans nos préparations de sous-unités 30S et 50S. En utilisant cette forme de dégradation, nous espérions obtenir un type de découpa reproductible et original, procurant des fragments d'ARN qui seraient différentes de ceux obtenus par les digestions avec la Rnase T1 ou pancréatique.

Par ailleurs, les protéines devraient protéger contre les digestions Rnasiques leur(s) site(s) d'interaction avec l'acide nucl ique permettant ainsi d'obtenir des fragments d'ARN possédant ces sites.

Nous montrerons que ce type de digestion offre un découpage de l'ARN en un nombre faible de fragments, la quantité et la taille de ces différents fragments dépendant de l'importance de la dégra-

dation des ARN ribosomiques pour une température donnée.

I - MISE EN EVIDENCE DE LA DEGRADATION DE L'ARN RIBOSOMIQUE PENDANT L'INCUBATION DES SOUS-UNITES RIBOSOMIQUES

A) Matériels et méthodes

1. - Tampons

A ; 0,005 M Tris-HCl pH 7,4, 0,0001 M MgAc

B : 0,005 M Tris-HCl pH 7,4, 0,0001 M MgAc, 0,06 M NH_4Cl, 0,006 M β-mercaptoéthanol

C : 0,005 M Tris-HCl, pH 7,4, 0,0001 M MgAc

D : 0,01 M NaAc, pH 4,5, 0,1 M NaCl

E : 0,01 M Tris pH 7,4, 0,1 M LiCl, 0,1 % SDS

2. - Préparation des ribosomes marqués au phosphore^{32}

Les ribosomes marqués au phosphore^{32} sont isolés à partir de cellules d'*E.coli* MRE 600, cultivées en milieu minéral 70 supplémenté avec du milieu enrichi en hydrolysat de caséine, en extrait de levure, et déphosphaté (200). Le temps de doublement est de 50 à 60 minutes. 100 ml de milieu inoculé avec des bactéries provenant d'une préculture sont divisées en deux sous-cultures de 50 ml lorsque la densité optique est de 0,05 à 0,1 à 420 nm. A l'une des deux cultures on ajoute entre 5 et 50 millicuries d'acide phosphorique (^{32}P) sans entraîneur, l'autre étant utilisée pour suivre par densité optique la croissance de la culture.

Cette croissance s'arrête entre les densités optiques allant de 2,2 à 2 le milieu s'épuisant en phosphate. Nous arrêtons le marquage lorsque la densité optique est de 2. On a dans ces conditions entre 70 et 80% d'incorporation de ^{32}P dans les bactéries. La culture est centrifugée à 15 000 g pendant 10 minutes, les cellules sont lavées par une mise en suspension dans 10 ml de tampon A ; suit une centrifugation de 10 minute à 15 000 g. Le culot est congelé et l'on extrait les ribosomes par broya à l'alumine et par centrifugations à basse et haute vitesse comme pour les préparations de ribosomes froids (c.f. : page 38). Les ribosomes 70S sont ensuite dissociés par centrifugation sur gradient linéaire de sucrose 5-20%, et précipités par 10% de polyéthylène glycol après avoir ajusté la concentration de MgAc à 10^{-2}M (187).

3. - *Analyse préliminaire sur gradient et gels de polyacrylamide de l'ARN ribosomique extrait des sous-unités purifiées.*

Les ARN ribosomiques sont extraits des ribosomes par addition de phénol (c.f. : page 28) ou sont dissociés des protéines par addition de SDS (0,5%) et déposés sur un gradient ou gel analytique.

Les gradients 5-20% de sucrose sont préparés dans le tampon D lorsque les échantillons sont extraits au phénol, ou dans le tampon E, lorsque l'ARN est dissocié des protéines ribosomiques par 0,5 % de SDS.

Nous n'avons pas détecté de différences sur gradient ou gels analytiques entre les deux méthodes de déprotéinisation, c'est pourquoi nous avons utilisé dans nos études ultérieures la déprotéinisation par le SDS qui est nettement plus rapide que le traitement au phénol. Cependant, lors de la préparation des fragments sur gel en plaqu

de polyacrylamide la déprotéinisation par le phénol permettait l'obtention de fragments d'une pureté plus grande, en diminuant les traînées d'une bande à l'autre.

Les gels de polyacrylamide 3% ou 5% sont faits dans les conditions décrites par Loening (201) dans des tubes de 0,6 cm de diamètre et de 7cm de long. L'électrophorèse est arrêtée après 4 heures, le champ électrique étant de 5-6 volts/cm. Les gels sont ensuite démoulés, congelés par immersion dans un bain d'hexane refroidi par du gaz carbonique solide (carboglace) puis découpés en tranches de 0,2 mm. Ces tranches sont déposées, soit sur des coupelles d'aluminium et comptées par un compteur Geiger "gas flow" soit comptées directement par effet Cerenkov.

B) *Résultats*

1. - *Préparation de ribosomes*

Le profil d'une préparation de sous-unités ribosomiques dont l'ARN est marqué au phosphore^{32} est illustrée dans la figure 15 après centrifugation sur gradient de sucrose. Il est à remarquer que ce profil est modifié notablement si les ribosomes sont extraits de cellules carencées en phosphate (lorsque la densité optique à 420 nm dépasse 2,2 avec notre milieu de culture), dans ces conditions, les deux sous-unités sont partiellement dégradées.

2. - *Etude analytique des ARN extraits de sous-unités ribosomiques après incubation*

a) Etude par centrifugation sur gradient de sucrose -

Différents profils de gradient d'ARN obtenus avant et après incubation à 40°C de sous-unités ribosomiques 30S sont illustrés dans la figure 16. L'ARN est extrait par le phénol après différents temps d'incubation et chauffé 3 mirutes à 90°C. Après 17 heures d'incubation, cette préparation de ribosomes 30S contient un ARN fortement dégradé. La précipitation par l'éthanol de l'ARN après l'extraction au phénol a permis l'élimination des oligonucléotides de petite taille.

b) Etude par électrophorèse sur gel de polyacrylamide -

Les profils obtenus après migration sur gel de polyacrylamide des ARN étudiés dans la figure 16 sont présentés dans les figures 17 et 18. Des ribosomes 30S sont incubés à 40°C pendant 17 heures, l'ARN est extrait, électrophorésé en présence de marqueurs 23S, 16S, 4S tritiés et le profil obtenu est illustré dans la figure 18. Le pic visible sur le gradient 4 de la figure 16 se résoud apparemment en une dizaine de produits. Les ARN extraits de ribosomes 30S incubés à 40°C et provenant de quatre marquages différents sont comparés sur gel de polyacrylamide. Les temps d'incubation varient selon les préparations. Bien que ces électrophorèses aient été faites dans des conditions identiques mais à des époques différentes, nous avons réuni les profils obtenus dans la figure 19. Il apparaît au premier abord que le nombre de fragments obtenus est faible, e que si la proportion relative des différents fragments évolue avec les

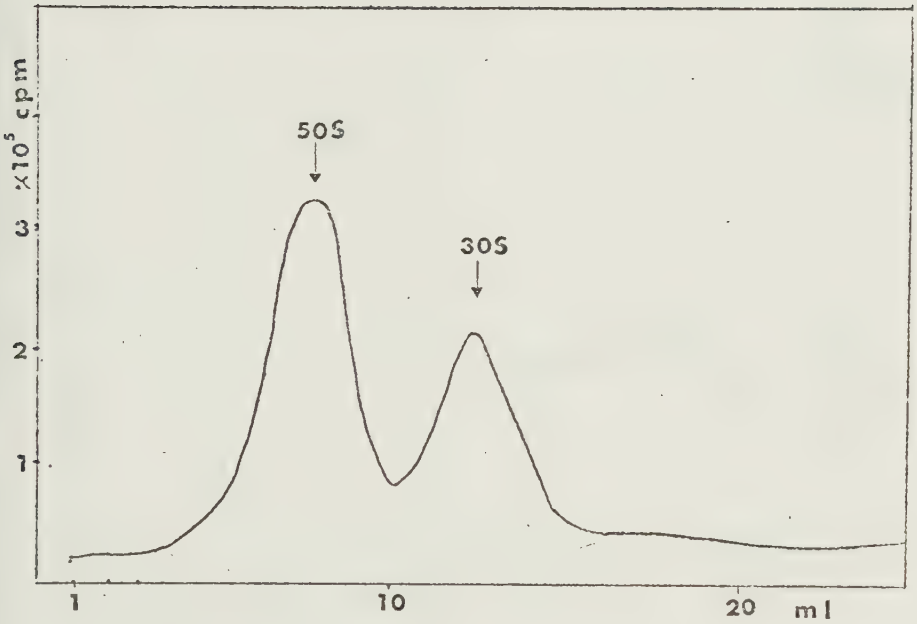


FIGURE 15 - Profil de séparation de sous-unités ribosomiques marquées au ^{32}P après centrifugation de 16 heures à 19 000 rpm dans un rotor SW 25.1 Spinco, à 4°C. Le gradient est de 5-20% de sucrose dans 0,01 M Tris pH 7,4 ; 10^{-4}M $MgCl_2$, 6 x 10^{-2}M NH_4Cl, 6 x 10^{-3} M β-mercaptoéthanol. Un aliquot de 10 µl est prélevé et compté

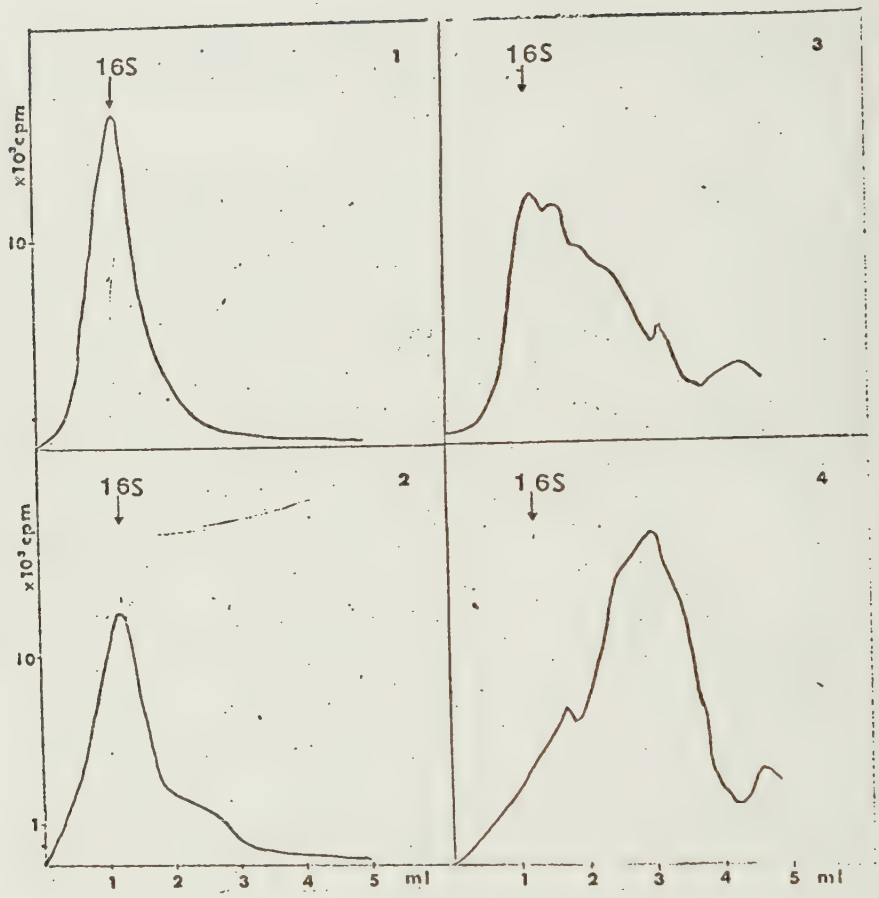


Figure 16 - Profils de centrifugation des gradients d'ARN extrait de sous-unités ribosomiques par traitement au phénol. La centrifugation sur gradient 5-20% de sucrose dans 0,01 M NaAc pH 4,5 ; 0,1 M NaCl est effectuée dans le rotor SW 50 à 4°C pendant 4 heures à 50 000 rpm. Les fractions sont recueillies directement dans les pots de compteur et comptées

(1) ARN 16S extrait de ribosomes 30S non incubés

(2) ARN 16S extrait de ribosomes 30S et chauffés 2 minutes à 90°C

(3) ARN 16S extrait après trois heures d'incubation à 40°C et chauffés 2 minut à 90°C

(4) ARN 16S extrait après 17 heures d'incubation à 40°C et chauffés 2 minutes

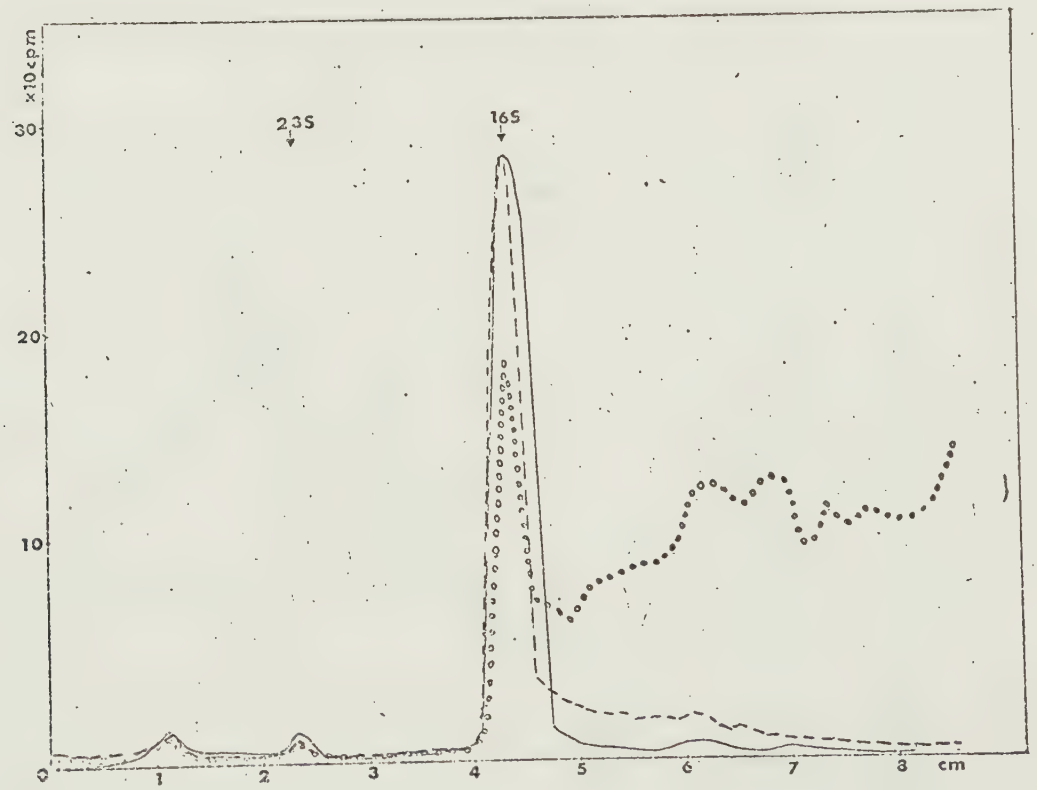


FIGURE 17 - Profils d'ARN 16S extraits de ribosomes après incubation et passage sur gradient (figure 16) électrophorèse sur gels de 3% de polyacrylamide à 3,5 mA par gel (201). Des tranches de gel de 2 mm sont comptées au compteur Gas flow.

—— ARN extraits de 30S non incubés --- ARN extraits de 30S non incubés, puis chauffés 2 minutes à 90°C

ARN extraits de 30S incubés 3 heures, puis chauffés

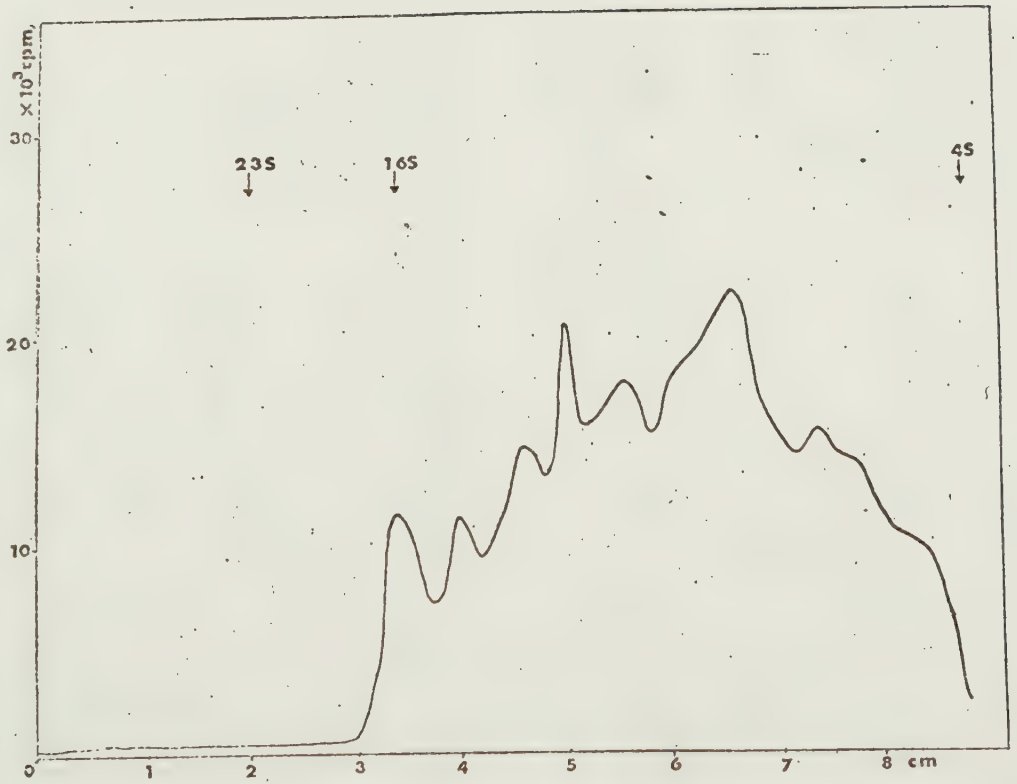


FIGURE 18 - Electrophorèse en présence d'ARN tritié 23S, 16S et 4S, d'un ARN extrait de particules 30S incubés 17 heures à 40°C, puis chauffé 2 minutes à 90°C. Le profil sur gradient de cet ARN est illustré dans la figure 16. L'ARN contenu dans des tranches de gel de 2mm est élué par dégradation alcaline (la nuit dans 5 ml de NH_4OH) et la radioactivité ^{32}P et ^{3}H comptées en scintillation liquide.

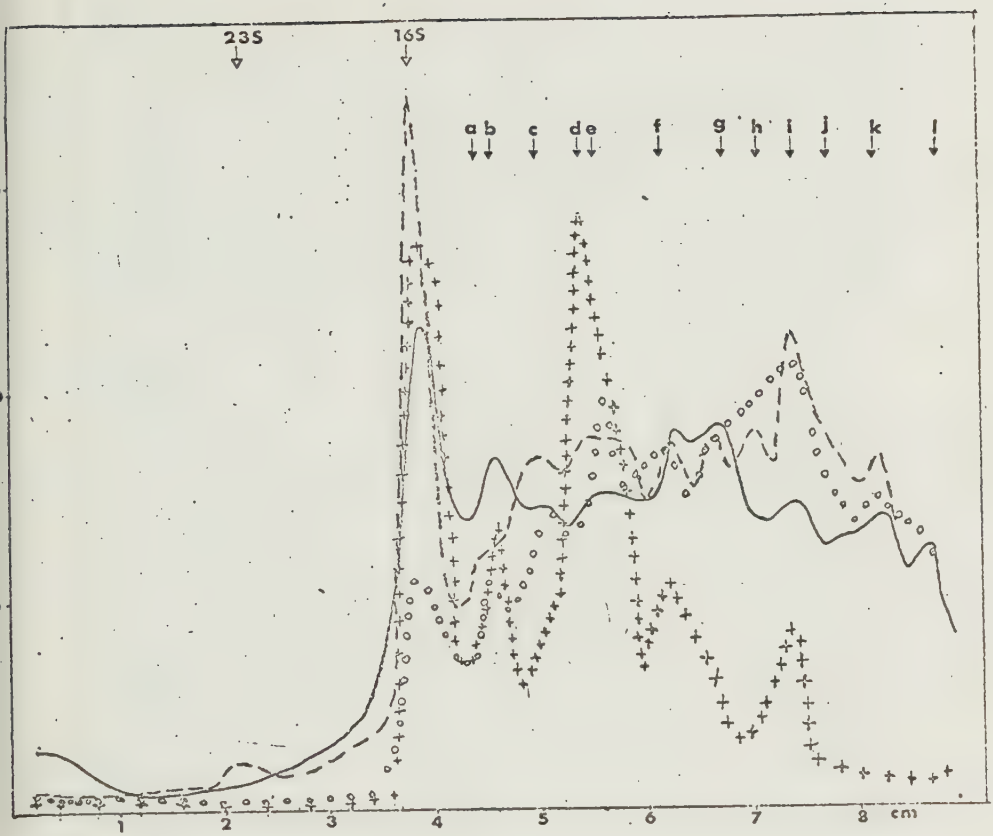


FIGURE 19 - Les ARN sont extraits au phénol après incubation de 4 préparations différentes de ribosomes 30S à 40°C et chauffés 2 minutes à 90°C. L'électrophorèse a lieu dans des gels différents mais dans des conditions analogues (voir figure 17). Les profils de la radioactivité sont représentés sur le même graphique.

temps d'incubation à 40°C

—— 17 heures

--- 8 heures

+++ 4 heures

ooo 17 heures

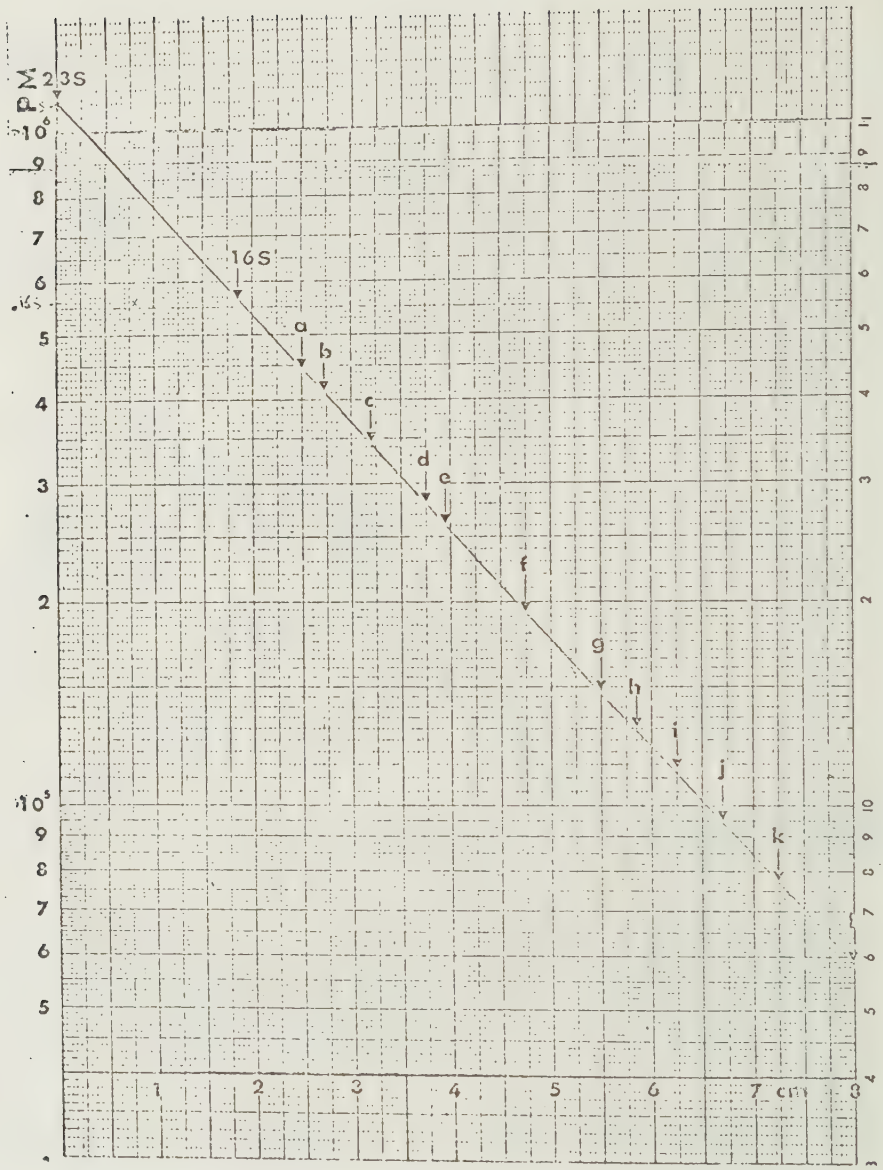


FIGURE 20 - Représentation en échelle semi-logarithmique des poids moléculaires des différents fragments d'ARN d'après leur migration dans le gel de la figure 5. L'étalonnage a été fait à l'aide des marqueurs ^{3}H 16S et 23S.

temps d'incubation, il ne semble pas qu'il y ait création ou disparition de fragments. Une estimation des poids moléculaires de ces fragments est présentée dans la figure 20. Ceci est possible grâce à la localisation des migrations des ARN 23S et 16S dans la figure 19. Les poids moléculaires s'échelonnent approximativement entre 60 000 et 450 000 daltons.

C) *Conclusion*

C'est sur la base de ces données que nous avons approfondi cette étude et développé une technique permettant une rapide analyse de la cinétique de la dégradation de l'ARN ribosomique. Les conditions de cette cinétique sont à préciser lors de chaque préparation de ribosomes afin d'obtenir une fraction suffisante de fragments d'ARN et de pouvoir ainsi isoler, purifier et caractériser les différents fragments.

II - EXEMPLES DE CINETIQUE DE DEGRADATION DE L'ARN DE SOUS-UNITES RIBOSOMIQUES PAR AUTODIGESTION ; ANALYSE PAR AUTORADIOGRAPHIE

A) Description de l'appareillage permettant une analyse rapide d'ARN ^{32}P électrophorésés sur gels de polyacrylamide

L'appareil, permettant l'autoradiographie des gels de polyacrylamide de 6mm de diamètre est constitué de trois éléments : un plateau (figure 21a), une feuille de polyéthylène (figure 21b) et un couvercle (figure 21c). Les détails techniques de construction sont décrits ailleurs (202). Un autoradiographie simultanée de 13 gels est possible. La longueur de l'appareil correspond aux dimensions maximales des films Rayons X Kodak, et la section des rigoles correspond approximativement à la section des gels. Ces gels sont placés dans les rigoles du plateau, le haut du gel en contact avec l'extrémité fermée de la rigole, le bas du gel étant bloqué par de la pâte à modeler, ceci afin d'assurer que les gels ne s'allongent pas lorsqu'ils sont déposés dans cet appareil. Une feuille de polyéthylène (0,2 mm d'épaisseur) recouvre les gels et un morceau de film Kodak RPSX-Omat est placé dans l'obscurité entre la feuille de polyéthylène et le couvercle. L'ensemble de l'appareil est alors compressé et maintenu à l'aide de pinces à dessin. Les gels cylindriques se déforment et épousent ainsi les formes parallèlépipédiques de la rigole, ceci sans se distendre en longueur. Après un temps d'exposition suffisant, le film est retiré puis développé.

Nous avons pu montrer que lorsque le temps d'exposition du film est suffisant, il existe une bonne corrélation entre les profils obtenus par enregistrement au microdensitomètre et ceux obtenus par découpage et comptage des gels. La figure 22 montre une courbe de calibration obtenue par autoradiographie de morceaux de gels de 1 cm de long contenant de 2 à 20 x 10^{-5} dpm de ^{32}P distribués uniformément dans leur volume. La densité optique du film est mesurée après une exposition de 30 minutes à l'aide d'un microdensitomètre Joyce.

Une comparaison entre les profils de ^{32}P obtenus après lecture d'une autoradiographie et après découpage et comptage du même gel est présentée dans la figure 23.

B) Etude par autoradiographie de la cinétique de dégradation de l'ARN après incubation de sous-unités ribosomiques

Les résultats de l'autoradiographie de gels de polyacrylamide sur lesquels ont été analysés les ARNs extraits de ribosomes 30S après différents temps d'incubation sont présentés dans la figure 24. Pour cette préparation une incubation de 15 heures à 40°C semble donner une bonne proportion de fragments de taille moyenne (P.M. 100 000 - 300 000) tandis qu'une incubation de 24 heures à 40°C produit une trop grande proportion de petits fragments (P.M. 100 000). La dégradation d'un ARN 16S après 3 heures d'incubation à 40°C d'une autre préparation de ribosomes 30S est illustrée dans l'autoradiographie et l'enregistrement au microdensitomètre de cette autoradiographie présentés dans la figure 25.

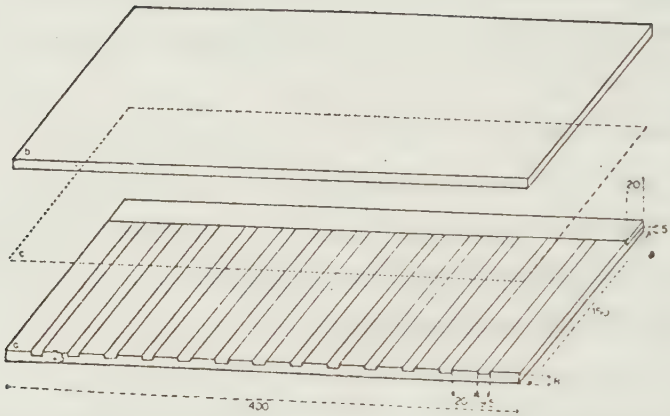


FIGURE 21 - construction de l'appareil pour autoradiographier les gels (les dimensions sont en millimètres)

a) plateau de plexiglass avec les rainures permettant de placer les gels

b) couvercle

c) feuille de polyéthylène

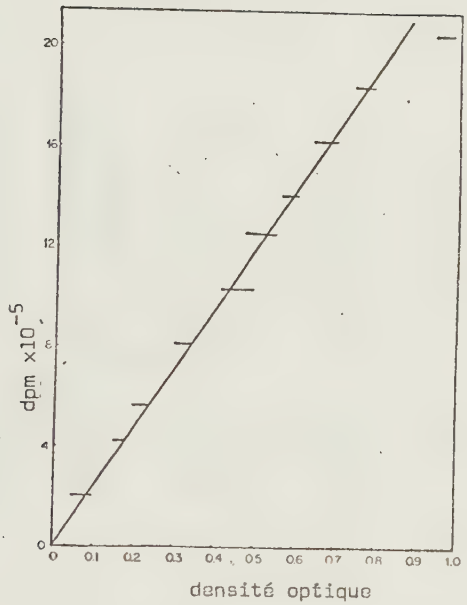


FIGURE 22 - Noircissement d'un film sensible aux rayons X obtenu après 0,5 heures d'exposition de petits gels cylindriques de 10 mm de longueur et de 6 mm de diamètre contenant des quantités variables de phosphore inorganique ^{32}P distribué uniformément dans le volume du gel. Chaque petit morceau de gel est préparé en trois exemplaires et différentes autoradiographies ont été faites pour chaque échantillon. Les densités optiques mesurées se trouvent à l'intérieur des barres horizontales représentées sur le graphe. La déviation standard pour deux niveaux de radioactivité a été estimée à 0,18 et 0,23.

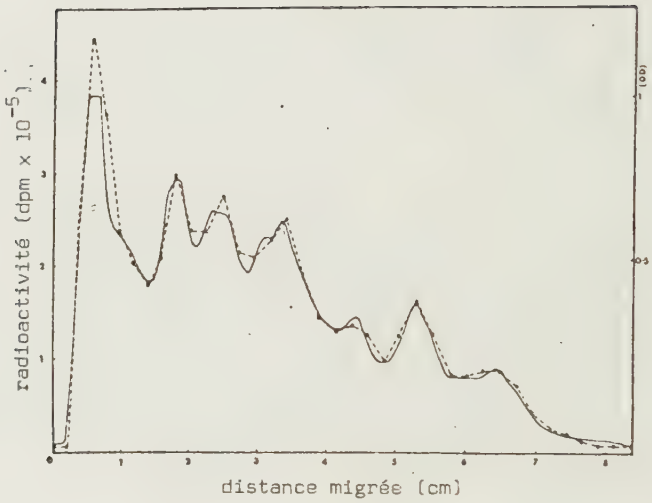


FIGURE 23 - Comparaison de profils de la distribution du ^{32}P obtenus après autoradiographie et après découpage et comptage de chaque tranche de gel. La distance migrée est mesurée à partir du haut du gel.

(——) l'absorption du film après exposit

(---) ^{32}P dpm par tranche de gel de 2 mm

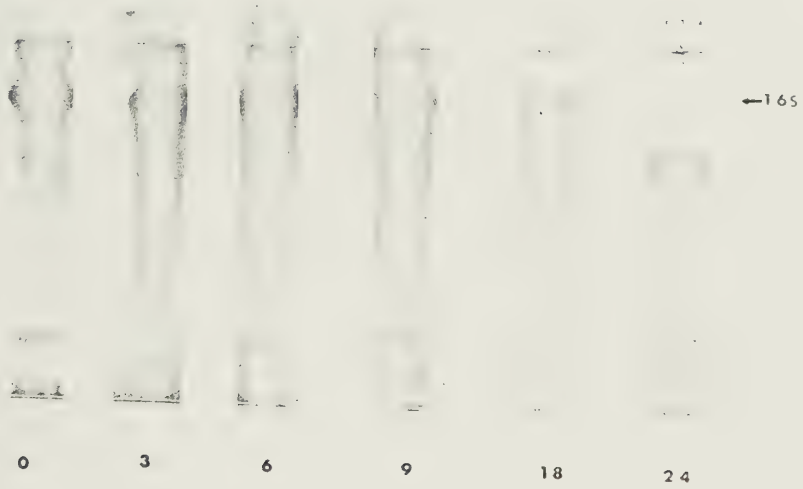


FIGURE 24 - Cinétique de dégradation de l'ARN 16S ^{32}P par auto-incubation de particules ribosomiques 30S. Les ribosomes sont incubés à 40°C pendant 0, 3, 6, 9, 18 et 24 heures dans un tampon Tris, $5x10^{-3}M$; Mg, $10^{-4}M$ pH 7,4, et l'ARN est extrait après addition de SDS 0,5 % puis chauffé 2 minutes à 90°C, avant d'être électrophorésé. Environ $2x10^{6}$ dpm ont été déposés sur chaque gel et le film a été exposé pendant 3 heures.

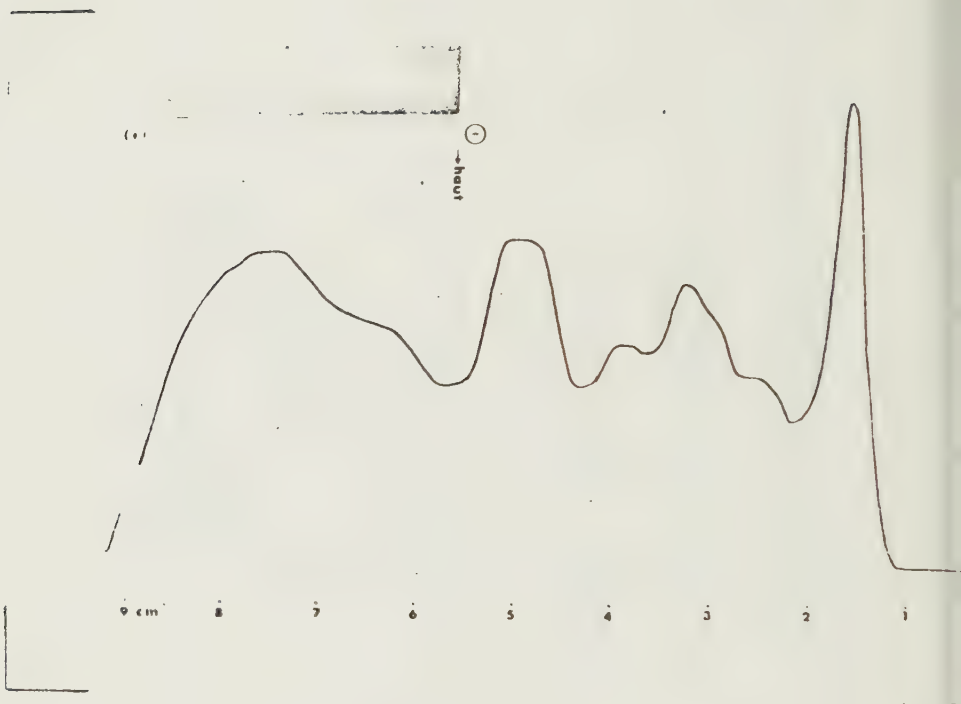


FIGURE 25 - Autoradiographie et enregistrement au microdensitomètre d'une migration d'ARN 16S ^{32}P après incubation à 40°C pendant 3 heures d'une préparation de ribosomes 30S différente de celle utilisée dans les études des figures 23 et 24.

FIGURE 26 - Cinétique de dégradation de l'ARN 23S ^{32}P dans des conditions identiques à celles de la figure 10

La figure 26 montre les résultats de l'analyse de la cinétique de dégradation de l'ARN 23S produite par l'incubation de ribosomes 50S dans les mêmes conditions. On note la présence de l'ARN 5S dans le bas des gels.

C H A P I T R E II

Formation et caractérisation d'un complexe ARN-protéine

I N T R O D U C T I O N

La fragmentation de l'ARN ayant été étudiée à l'échelle analytique lors de chaque préparation de ribosomes : la purification des fragments à l'échelle préparative, la caractérisation de ces fragments, la formation et l'isolement de complexes *in vitro* avec des protéines ribosomiques et l'identification des protéines présentes dans ces complexes nous ont dans certains cas obligés à mettre au point des techniques nouvelles. Certaines de ces techniques sont décrites et les résultats obtenus pour un complexe nous permettent d'illustrer cette étude.

I - MATERIELS ET METHODES

A) Purification de fragments de l'ARN 16S

1. - Préparation des plaques de gel

Nous utilisons l'appareil de C. Ehresmann et coll. (86) légèrement modifié afin que le tampon du haut soit directement en contact avec le dessus de la plaque de gel, évitant ainsi l'utilisation d'un pont en papier imbibé de tampon. Nos séparations se font sur un gel contenant 5% d'acrylamide 0,1% de bisacrylamide dans le tampon Tris-acide borique pH 8,6 en présence de 0,1 % de SDS (86, 203).

L'échantillon d'ARN après extraction au phénol, précipitation à l'éthanol et chauffage 2 minutes à 90°C est rendu plus dense par l'addition d'un volume d'urée 8 M et coloré à l'aide de bleu de bromophénol. L'électrophorèse dure approximativement 15 heures sous un champ de 5 volts/cm (75 à 100 mA par plaque). Le tampon de l'électrode supérieure est recyclé en permanence avec celui de l'électrode inférieure afin d'éviter des variations de pH importantes dans le gel. Après l'électrophorèse, la plaque est démoulée d'une seul côté et recouverte d'une feuille de polyéthylène, puis autoradiographiée.

2. - Etude de la pureté des bandes par électrophorèse

Afin de contrôler l'homogénéité des préparations de fragments d'ARN, le contenu de certaines des bandes détectées par autoradiographie a été analysé par électrophorèse sur plaque de gel d'acrylamide en présence de 8 M d'urée (204). Cette technique est très résolutive et des populations d'ARN de tailles légèrement différentes peuvent être séparées puisque les ARN sont alors dénaturés. La bande de gel à étudier est découpée de la plaque préparative et après dialyse contre de l'eau, est incluse dans le haut d'une plaque de gel contenant 6% d'acrylamide et 8 M d'urée.

3. - Elution de fragments d'ARN des gels

La technique utilisée pour éluer des fragments d'ARN de bandes de gels lors des études par fingerprint consiste à électrophoréser sur DEAE l'ARN après broyage du gel et d'éluer cet ARN à l'aide de triéthylamine neutralisée par du CO_2 à pH 9,8 (205). Malheureusement, cette

technique provoque une dégradation de l'ARN (probablement due au traitement alcalin prolongé de quelques heures à température ambiante). Cette dégradation de l'ARN est suffisamment faible pour ne pas perturber l'étude par fingerprint, mais trop importante pour nos expériences de reconstitution. C'est pourquoi nous avons fait une étude comparative de différentes techniques d'élution : nous utilisons une modification de la première méthode proposée par Sanger et coll. (205), le papier DEAE ayant retenu l'ARN électrophorésé hors du gel est lavé à l'eau distillée afin d'éliminer le maximum de débris d'acrylamide et l'élution de l'ARN est obtenue à 4°C par filtration à travers le papier DEAE de deux fois 0,5 ml d'une solution à 33% de triéthylamine neutralisée à pH 9,8, par de l'acide chlorhydrique fumant. 0, 1 ml de chlorure de sodium 1 M est ensuite ajouté à l'éluat, et l'on précipite l'ARN par l'addition de 2,5 ml d'éthanol à -20°C. L'ARN ainsi récupéré après centrifugation n'est pas dégradé, et les rendements restent suffisants. Parfois la précipitation de l'ARN par de l'acide perchlorique décrite par Brownlee (206) est nécessaire pour éliminer l'acrylamide encore présente dans l'éluat. La présence d'acrylamide rend plus difficile les manipulations pour les fingerprints.

B) Etude par fingerprint de certains fragments d'ARN

Les fingerprints des produits de digestion de l'ARN 16S par la Rnase T1 sont réalisés par électrophorèse en deux dimensions (205) en utilisant les conditions mises au point pour l'ARN 16S (86, 92).

La pureté et l'homogénéité des fragments sont évaluées par le découpage dans les fingerprints de taches qui correspondent à des oligonucléotides connus de l'ARN 16S (92) et la détermination de leurs radioactivités spécifiques (c'est-à-dire la radioactivité par atome de phosphore).

C) *Préparations de protéines ribosomiques marquées au ^{35}S et formation in vitro de complexes ARN-protéines*

Des bactéries *E.coli* MRE 600 sont cultivées dans 100 ml de milieu 63 appauvri en sulfate (169) et en présence de 100 mCi de soufre ^{35} inorganique, puis la culture est arrêtée lorsque 60% du soufre est incorporé. Les ribosomes sont extraits et séparés dans les mêmes conditions que celles utilisées pour la préparation des ribosomes marqués au phosphore 32. Les protéines ribosomiques sont extraites au chlorure de lithium-urée, et dialysées contre le tampon de reconstitution (C.f. page 38) (126). L'activité spécifique des protéines ribosomiques est mesurée dans les ribosomes en radioactivité par l'unité de densité optique à 260 nm.

Une partie de la préparation de fragments purifiés de l'ARN 16S est incubée dans les conditions de reconstitution (126) avec l'ensemble des protéines ribosomiques 30S S^{35}. Les proportions du mélange de reconstitution sont calculées pour avoir un équivalent d'ARN en présence de 1,2 équivalent de protéines 30S S^{35}.

D) *Electrophorèse sur gel d'acrylamide-diallyltartardiamide des complexes ARN-protéines*

Après incubation, le mélange frament d'ARN-protéines 30S est rendu plus dense par l'addition de 1/10e de volume de sucrose 50% coloré au bleu de brompophénol (1‰) puis déposé au-dessus d'un gel de polyacrylamide de 10 mm de diamètre et de 120 mm de longueur contenant 7,5% d'acrylamide et 1,2% de NN'Diallyltartardiamide à la place du bisacrylamide (207). Le tampon d'électrophorèse contient 10^{-2}M Tris HCl, pH 7,8, 10^{-4}M $MgCl_2$, 0,35 M KCl, $6x10^{-3}$ β-mercaptoéthanol (136). Les gels sont polymérisés dans du tampon 10^{-2}M Tris-HCl pH 7,8, 10^{-4}M $MgCl_2$, 0,35 M KCl car une concentration plus élevée de magnésium et la présence de β-mercaptoéthanol empêchent la polymérisation du gel. Une préélectrophorèse à 4°C pendant 3 heures sous une intensité de 15 mA par tube permet grâce à un recyclage entre les tampons du bac supérieur et inférieur une équilibration du tampon d'électrophorèse dans le gel. L'électrophorèse s'effectue ensuite pendant 16 heures dans les mêmes conditions que pour la préélectrophorèse (4°C, 15 mA/tube, recyclage du tampon). La haute force ionique du tampon d'électrophorèse est nécessaire pour maintenir la spécificité des complexes formés (136). Dans ces conditions, le colorant bleu de bromophénol migre de 50 à 60 mm. Le gel est ensuite découpé en tranches de 2 mm que l'on compte par effet Cerenkov dans un compteur à scintillation liquide. Chaque tranche est ensuite hydrolysée avec 1 ml d'acide périodique à 2% pendant 2 heures, à 28°C. Dans ces conditions, le diallyltartardiamide est coupé et le gel redevient liquide, les chaînes de polyacrylamide n'étant plus pontées entre elles (207). Un aliquot de cette solution

de gel est prélevé et la radioactivité S^{35} et P^{32} comptée après addition de liquide scintillant.

E) *Caractérisation des protéines ribosomiques migrant électrophorétiquement avec un fragment d'ARN 16S*

1. - *Extraction des protéines des complexes*

Après comptage de la radioactivité contenue dans chaque tranche de gel, les fractions correspondant à un pic commun en radioactivité S^{35} et P^{32} sont réunies. On ajoute 80 DO à 260 nm de ribosomes 30S non radioactifs à cette solution. L'addition d'acide perchlorique (10% final) permet la précipitation des ribosomes froids et des complexes ARN-protéines, éliminant ainsi les chaînes de polyacrylamide présentes dans la solution après hydrolyse du gel par l'acide périodique. Les protéines sont ensuite extraites par le chlorure de lithium-urée (c.f. page 38).

2. - *Electrophorèse en deux dimensions des protéines ribosomiques*

Nous utilisons les conditions et l'appareillage décrit par Kaltschmidt et Wittmann (209) ; cependant, afin d'éviter des pertes importantes de protéines dans le gel d'échantillon de départ (116), nous avons séparé uniquement les protéines basiques en déposant l'échantillon de départ dans 100 µl d'urée 8 M au-dessus d'une colonne de gel de première dimension. Dans la technique habituelle, l'échantillon est mélangé avec une solution de gel, puis polymérisé au milieu de la colonne. Dans nos conditions, à l'exception d'une fraction de la protéine S8 dont le point isoélectrique est très proche du pH utilisé dans l'électrophorèse de la première dimension, les protéines

en urée 8 M migrent toutes, soit dans le gel (protéines basiques) soit dans le tampon de l'électrode supérieure (protéines acides S1, S2, S6, S10). Après coloration des plaques, les taches correspondant aux protéines ribosomiques 30S sont découpées dans le gel à l'emporte-pièce et hydrolysées par de l'eau oxygénée pendant la nuit à 55°C, (0,5 ml d'H_2O_2 à 110 volumes par rondelle de gel de diamètre 8 mm et 6 mm d'épaisseur) (210, 211). Le comptage se fait après addition de 10 ml de solution scintillante triton-toluène-PPO-POPOP et une courbe d'affaiblissement du comptage en fonction de la quantité de gel hydrolysé est faite en utilisant le standard externe du compteur à scintillation.

II - RESULTATS

A) Séparation sur plaque des fragments d'ARN

Des autoradiographies obtenues après séparation sur plaque de fragments d'ARN ^{32}P provenant de différentes préparations de ribosomes incubés sont présentées dans les figures 27, 28. Les bandes principales sont notées sur le côté. L'incubation d'une autre préparation de ribosomes 30S à 40°C, pendant 4 heures et 17 heures, permet d'obtenir des dégradations présentées dans l'autoradiographie de la figure 27 ; nous voyons nettement que les principales bandes visibles après 4 heures d'incubation sont probablement les mêmes après 17 heures, les bandes les plus rapides s'étant enrichies en radioactivité au détriment des bandes plus lentes. Ceci suggère que certains petits fragments d'ARN proviennent de la dégradation d'un fragment plus important visible sur la même plaque. La figure 28 illustre la dégradation de l'ARN dans une autre préparation. On peut remarquer la similitude des profils de dé-

gradation obtenus pour les trois préparations différentes, et le nombre limité de fragments.

B) *Contrôle de l'intégrité des fragments d'ARN par électrophorèse sur gel en plaque en présence d'urée 8 M*

Les bandes a, b, c, de la figure 27 sont découpées, électrophorésées dans une plaque de gel contenant 8 M d'urée puis autoradiographiées (figure 29), il ne semble pas que ces fragments contiennent de coupures internes (qui seraient alors révélées) ; par ailleurs, les bandes semblent contenir des populations d'ARN de tailles identiques.

Dans les études d'interactions des fragments et des protéines, nous avons dû renoncer à cette étape supplémentaire de purification, car le passage en urée rend la formation de complexes ARN-protéines beaucoup plus difficile.

C) *Etude des différentes techniques d'élution de fragments d'ARN dans les gels*

Différentes techniques d'élution des gels de fragments d'ARN sont comparées dans le tableau 2. Les fragments élués sont des fragments de 23S dont les poids moléculaires s'échelonnent approximativement de 10^6 à $0,3 \times 10^6$ daltons. On constate que l'élution du gel est d'autant meilleure que l'ARN est petit. Les rendements sont calculés par rapport à l'étape précédente. Le rendement final est le rapport entre la radioactivité récupérée finalement dans l'échantillon et la radioactivité comptée dans le morceau de gel découpé de la plaque. Le rendement obtenu par la technique décrite par Brownlee (206) est faible, mais l'ARN ne

semble pas contaminé par de l'acrylamide, par contre, la technique décr par Loening (208) nous donne un ARN très contaminé par de l'acrylamide. De peur de dénaturer l'ARN par prépipitation à l'acide perchlorique, nous avons finalement utilisé notre technique d'élution qui nous permettrait d'obtenir avec un rendement suffisant des fragments d'ARN en bon état sans contaminations importantes d'acrylamide (c.f. page 95).

D) Caractérisation par fingerprints de fragments d'ARN 16S

Les figures 30 et 31 montrent les fingerprints de deux fragments obtenus à partir de différentes préparations : les fragments j de la plaque de la figure 27, et le fragment i de la plaque de la figure 28. A partir de données publiées (92-93), et reproduites dans les figures 4 et 32, il est possible d'interpréter ces fingerprints. Un certain nombre de taches du fingerprint du fragment f ont été identifiées et comptées. Les résultats sont présentés dans le tableau III. La radioactivité comptée pour chaque oligonucléotide a été divisée par le nombre de phosphores présents dans l'oligonucléotide considéré. Pour les oligonucléotides appartenant au fragment j, nous observons une radioactivité comprise entre 20 et 40 cpm par phosphore. Pour des oligonucléotides extérieurs à ce fragment, la radioactivité est voisine de 10 cpm par phosphore. Ce calcul permet d'évaluer la pureté de ce fragment aux environs de 70%, sa taille est d'environ 500 nucléotides à partir de l'extrémité 5', et correspond à la région L-P" de l'ARN 16S. Une étude analogue a été faite sur le fragment i (figure 31) et prove-

FIGURE 27 - Autoradiographie après électrophorèse de l'ARN 16S dégradé par incubation à 40°C de sous-unités ribosomiques 30S dans le tampon d'incubation pendant 4 heures (à droite), et 17 heures (à gauche).

200 x 10^6 dpm ont été déposés dans chacun des puits d'échantillon. L'électrophorèse a duré 16 heures dans les mêmes conditions que celles utilisées dans la figure 12. L'autoradiographie a duré 30 minutes.

FIGURE 28 - Autoradiographie après électrophorèse d'ARN 16S marqué au P^{32} et dégradé après une incubation de sous-unités ribosomiques 30S pendant 17 heures. 200×10^6 dpm sont déposés dans chacun des puits d'échantillon. L'électrophorèse a duré 17 heures dans les conditions analogues à celles décrites dans la légende de la figure 12. L'autoradiographie a duré 30 minu

FIGURE 29 - Autoradiographie après électrophorèse des fragments a, b, c découpés à partir de la préparation de la figure 13. Le gel contient de l'urée 8 M et l'électrophorèse a duré 3 heures dans les conditions décrites dans le mode opératoire. L'autoradiographie a duré 1 heure.

FIGURE 30 - Fingerprint du fragment j de la plaque figure 2

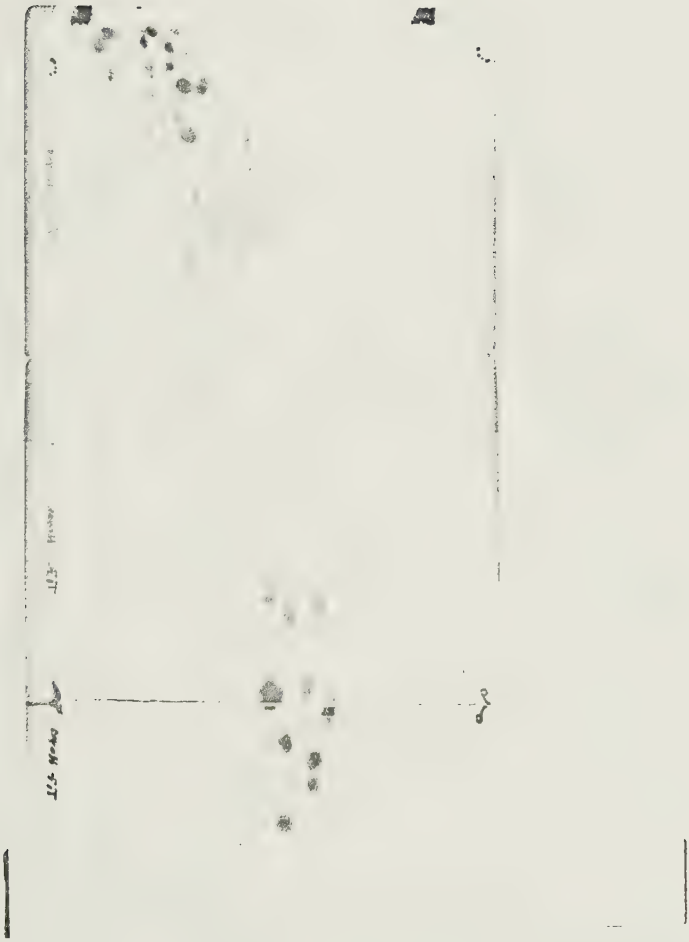


FIGURE 31 - Fingerprint du fragment i de la plaque figure 28

TABLEAU II

Comparaison de trois méthodes d'élution de fragments d'ARN d'une plaque de gel d'acrylamide

	Méthode décrite par Brownlee et Cartwright (206)		méthode décrite par Loening (208)		Méthode proposée		
P.M. approximatif du fragment	490×10^3	300×10^3	580×10^3	420×10^3	1000×10^3	520×10^3	380×10^3
Elution du gel	Broyage dans 0.4 NaCl		Broyage dans 0.6 AcLi		Electrophorèse sur papier DEAE		
rendement %	50	80	56	52	50	74	92.5
récupération	surnageant de centrifugation		surnageant de centrifugation		sur papier DEAE		
purification	extraction au phénol		—		elution par triethénolamine-HCl pH 9,8		
rendement %	91	82	—		86	81	77
précipitation éthanol	94	70	95	95	70	89	56
Précipitation 1%	72	85	—	—	—	—	—
Précipitation (2e) éthanol	53	23	—	—	—	—	—
Filtration sur millipore	100	100	—	—	—	—	—
Rendement final	16	9	53	50	30	54	40
Importance du culot après la dernière précipitation à l'éthanol (ARN+acrylamide)	très faible	très faible	gros	gros	très faible	très faible	faible
Etat de l'ARN après chauffage. Etude sur gel	Intact	Intact	Intact	Intact	Intact	Intact	dégradé

FIGURE 32, - Reproduction du fingerprint de l'ARN 16S et dessin et numérotation des oligonucléotides.

TABLEAU N° 3

radioactivité de certains oligonucléotides caractérisés et découpés d'après leur migration dans le fingerprint

Oligonucléotide	cpm	nombre ^{32}P	cpm ^{32}P	fragments	oligonucléotides faiblement présents	cpm	nombre ^{32}P	cpm ^{32}P	fragm
1	500	12	42	I	2	180	15	12	K
7	240	9	28	I	6	22	7	3	D
9	200	10	20	H	8	100	10	10	A
11	150	7	21	B	10	50	10	5	E
16	350	7	50	I	15	20	7	3	N
17	450	7	64	F	18	100	5	20	E'
20	180	4	15	L,C	19	80	12	7	E
22	120	11	11	L	21	80	8	10	P
23	200	7	29	L	26	100	11	9	A
25	250	8	41	M	37	160	11	14	P
296	350	7	50	R	40	80	6	13	E
309	720	10	72	C,M	42	80	5	16	K
31	170	11	15	R					
34	210	6	35	L					
36	310	7	44	F					
38	150	5	30	Q					
396	160	5	32	H'					
43	210	7	30	I					
44	450	4	115	E					
49	290	6	48	I,O,D					
51	360	4	90	L,C					
53	610	4	152	R,H',G,E					
54	400	3	133						
56	80	7	11	B					
57a	380	6	63	M'					
61	110	7	16	M					
63b	150	6	25	L					
66	580	5	118	I,C"					
68	320	5	64	M,C					
73	350	4	88	4 dont D					
74	80	5	16	Q,N					
75a	180	6	30	F					
76a	150	5	30	B					

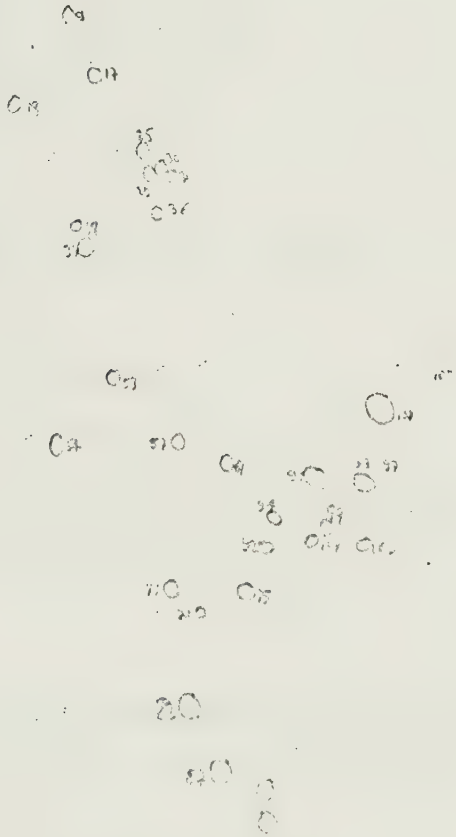


FIGURE 33 - Schéma de la disposition des principales taches présentes dans le fingerprint de la figure 31.

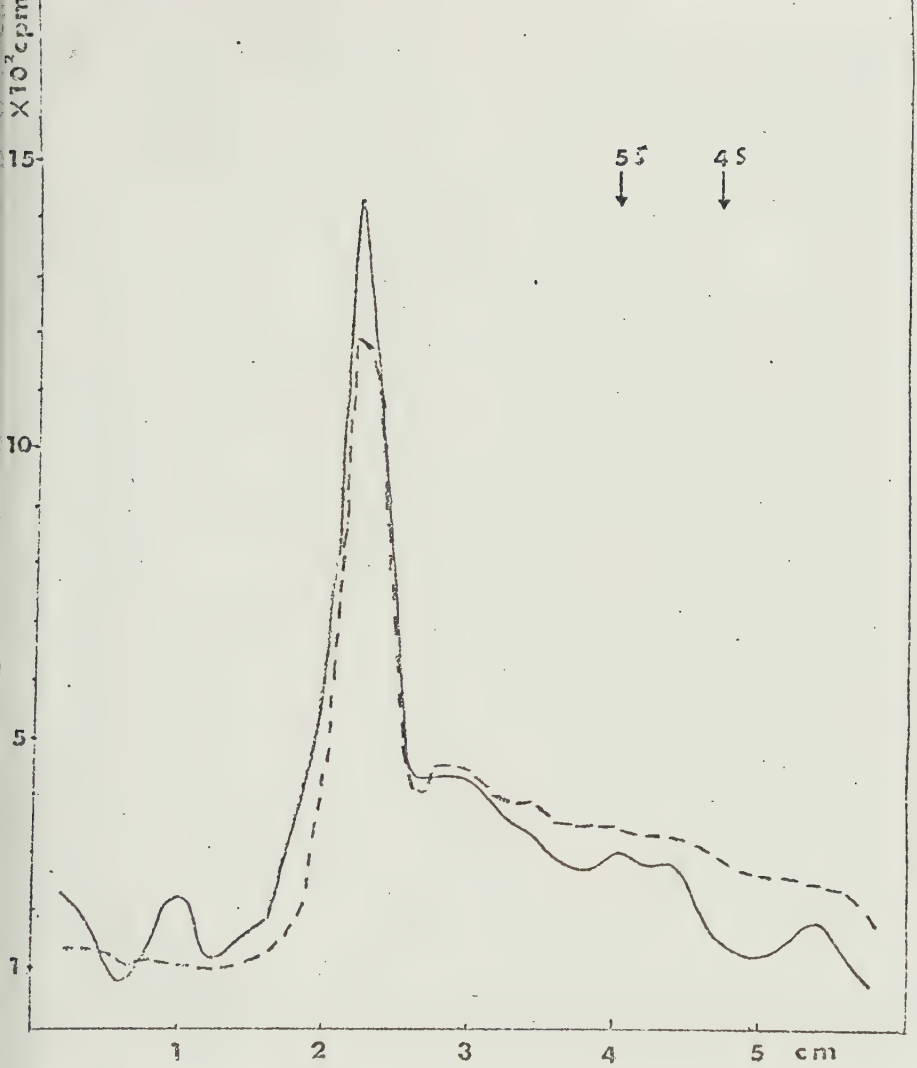
nant d'une autre préparation. Le fingerprint a été réalisé à Strasbourg dans le laboratoire du Professeur J.P. Ebel, par les Dr P. Fellner et C. Ehresmann, et l'analyse montre qu'il s'agit d'un fragment 60 à 70% pur, d'environ 250 nucléotides correspondant à la région H"-M de l'ARN 16S. La figure 33 est le dessin des taches principales visibles sur le fingerprint du fragment i (figure 31).

E) Etude analytique sur gel de polyacrylamide du fragment H"-M

Le fragment H"-M est électrophorésé sur gel de 7,5 % d'acrylamide en présence d'ARN 5S et ARN 4S marqués à l'uracile ^{3}H. Le profil obtenu est illustré dans la figure 34, avant et après chauffage du fragment d'ARN pendant 2 minutes à 90°C. Le poids moléculaire est estimé à 115 000 (figure 35). La moitié de la radioactivité migre dans un pic, le reste correspond sans doute à des produits de dégradation.

F) Formation in vitro *du complexe: fragment H"-M et protéines ribosomiques 30S S^{35}*

Nous montrons les résultats obtenus avec le fragment H"-M de l'ARN 16S. La figure 36 représente les profils de la radioactivité ^{35}S et ^{32}P obtenus après migration sur gel du mélange de reconstitution : fragment H"-M ^{32}P et protéines 30S S^{35}. Le pic de radioactivité S^{35} coïncide avec la partie lourde du pic de radioactivité ^{32}P. Une partie de l'ARN n'a donc pas réagi avec les protéines ; peut-être s'agit-il d'ARN dégradé et de contaminants autres que le fragment



URE 34 - Electrophorèse sur gel d'acrylamide à 7.5% (201) du fragment H"-M en présence de marqueurs ^{3}H ARN 4S et 5S

——— ARN non chauffé

----- ARN chauffé 2 minutes à 90°C

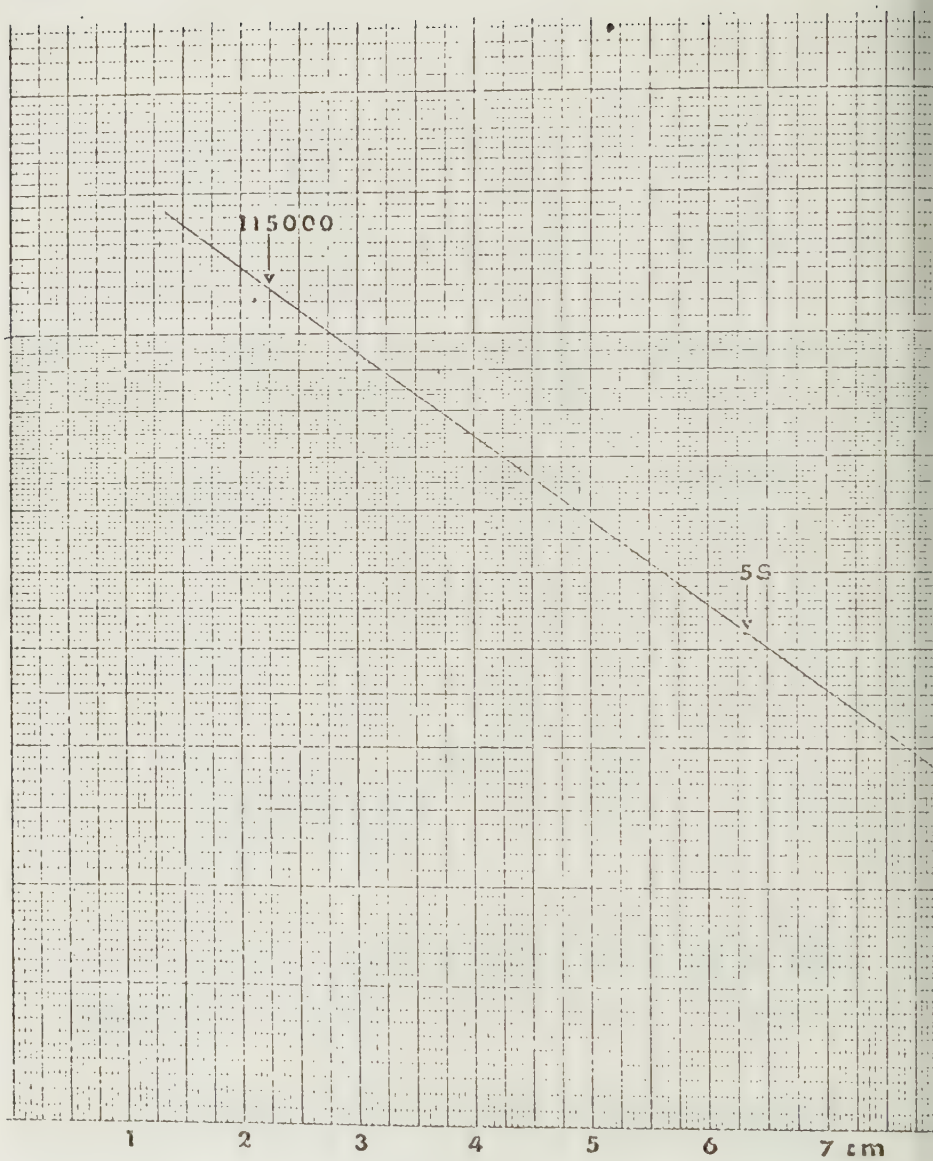


FIGURE 35 - Estimation du poids moléculaire du fragment H"-M

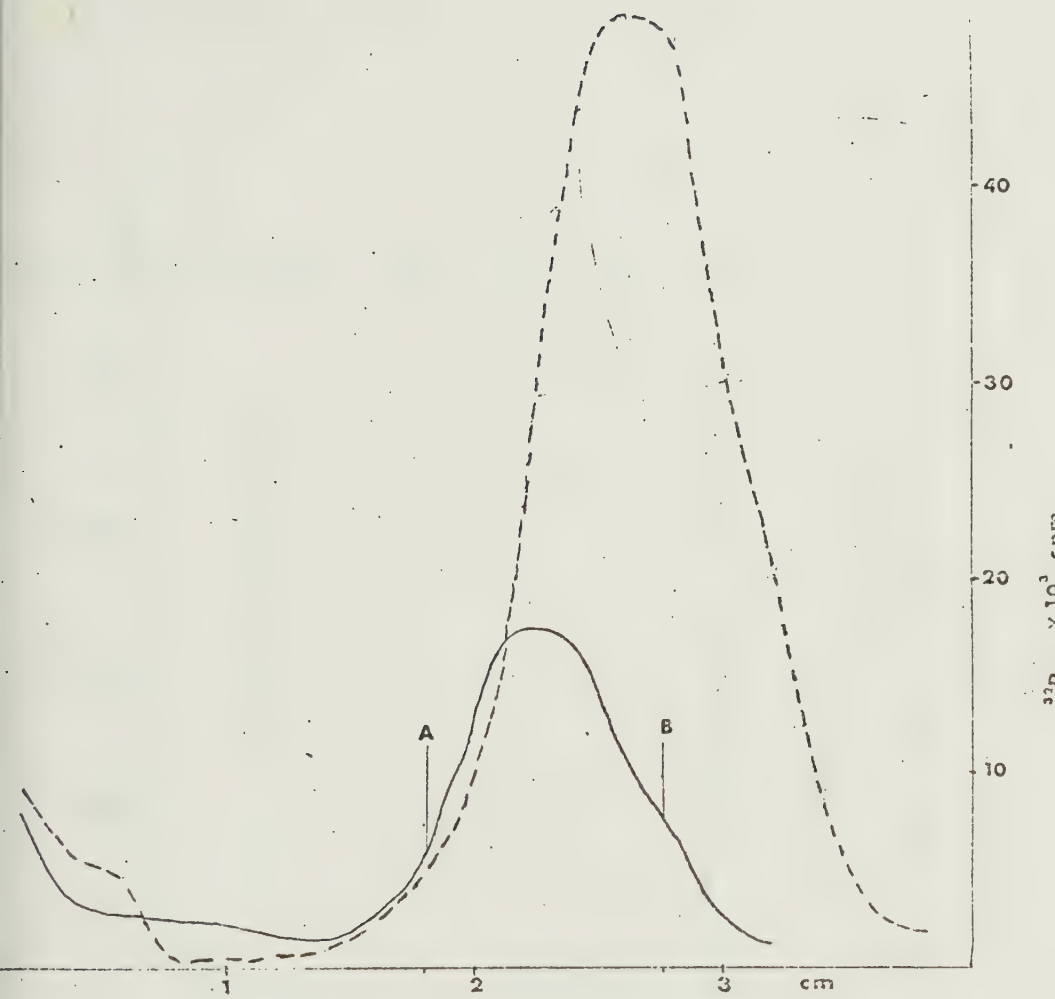


FIGURE 36 - Profil de l'électrophorèse du complexe fragment H"-M ^{32}P-protéines ribosomiques ^{35}S. 400 000 cpm de ^{32}P (1,6 D.O. 260 nm d'ARN) et 450 000 cpm de protéines ^{35}S extraites à partir de 2,0 O.D. de ribosomes, ont été incubés dans les conditions de reconstitution et électrophorésés. Après élution, le gel est coupé en tranches de 2 mm, un aliquot de chaque tranche est compté. La radioactivité totale ^{35}S et ^{32}P est représentée en ordonnée sur le graphe, en fonction de la distance migrée dans le gel

—— ^{35}S

--- ^{32}P

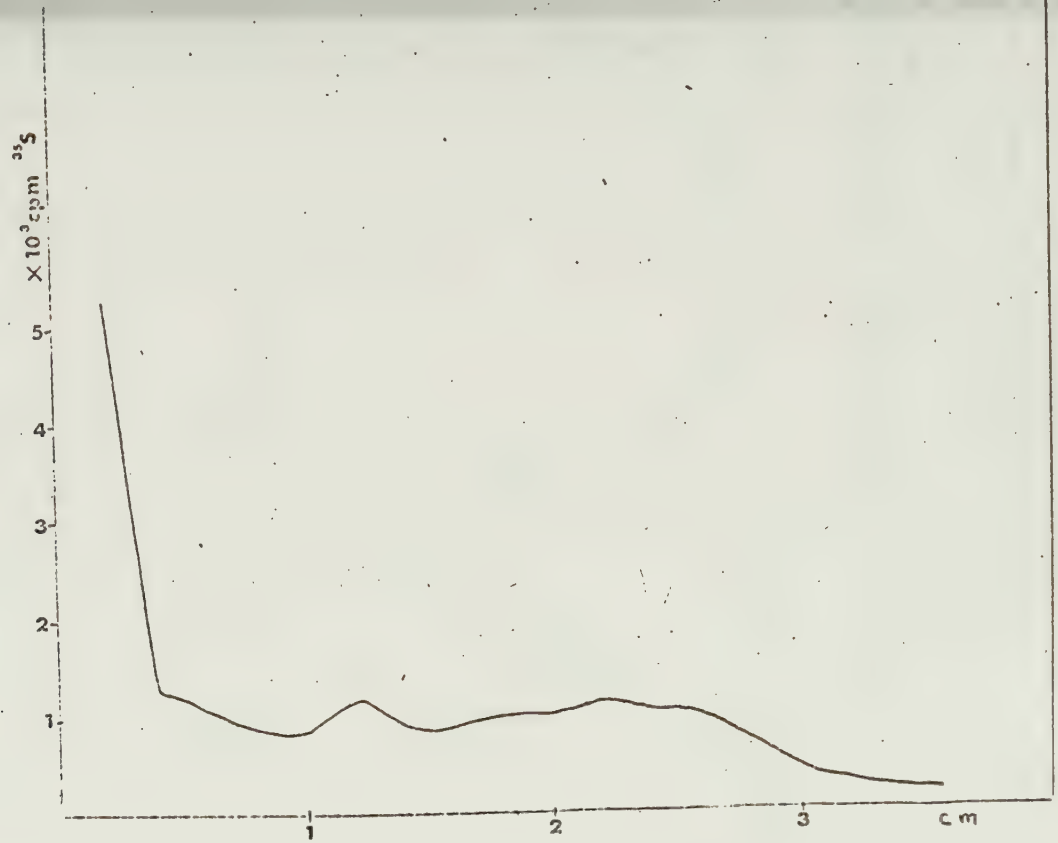


FIGURE 37 - 500 000 cpm de protéines ^{35}S sont électrophorésés et traités comme pour la figure 36

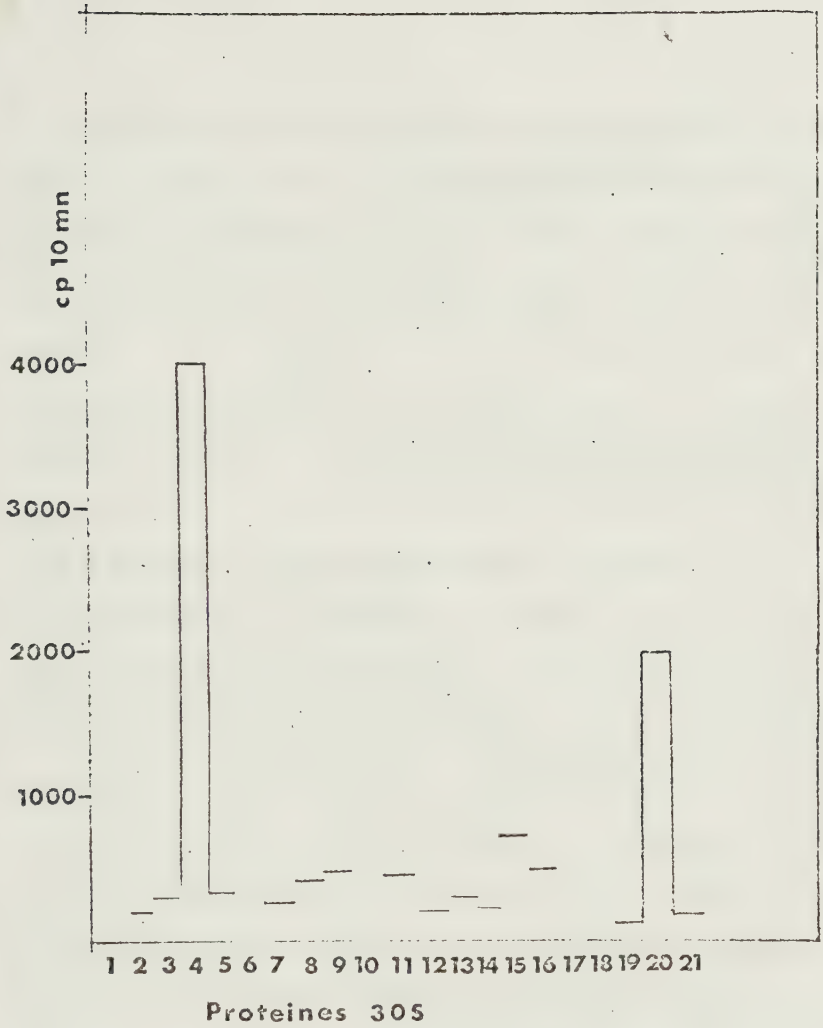


FIGURE 38 histogramme représentant la distribution de la radioactivité soufre 35 après électrophorèse des protéines ribosomiques 30S

H"-M ? La très haute conductivité du tampon d'électrophorèse ne permettant pas de mieux séparer les produits, un gel de contrôle (figure 37) chargé uniquement avec des protéines ribosomiques 30S S^{35} permet de vérifier qu'il n'y a pas de radioactivité S^{35} ayant migré dans le gel à la position de migration du S^{35} de la figure 36.

G) *Séparation sur plaque en deux dimensions des protéines ribosomiques ayant interagi avec le fragment H"-M*

Les protéines ^{35}S présentes dans la région A-B du gel de polyacrylamide dont l'analyse est présentée dans la figure 36 ont été extraites et caractérisées par électrophorèse en deux dimensions (c.f. page 106). L'histogramme obtenu après comptage du soufre^{35} dans les protéines éluées du gel, et ayant formé un complexe avec le fragment H"-M de l'ARN 16S est présenté dans la figure 38. Deux pics correspondant aux protéines S4 et S20 apparaissent nettement dans un rapport de radioactivité S4/S20 peu différent de 2, le bruit de fond ayant été soustrait (cpm). Le "quenching" lors du comptage est constant pour chaque échantillon (de l'ordre de 2,1 à 2,2) et correspond à un affaiblissement de 10 à 15%.

III - DISCUSSION

Le nombre d'atomes de soufre est de 3 dans chacune des protéines S4 et S20 (c.f. page 136). Nous pouvons penser n'avoir fixé qu'une moitié des protéines S20 par rapport aux protéines S4 présentes dans les complexes. Ces résultats se rapprochent des études stoichiométriques d'interactions de S4 et S20 avec les fragments 12S (L - O)

qui ont montré que lors de l'incubation de ce fragment avec 1,2 équivalent de S4 et S20, on obtient une fixation de 0,9 molécules de S4 et 0,3 molécules de S20 (140). Cependant, chez ces auteurs, les fragments 9S (L - C") et 4S (C" - O) obtenus dans un autre type de digestion ne peuvent pas fixer la protéine S20, même en présence de la protéine S4 fixée sur le fragment L - C". Un résultat analogue a été trouvé avec le fragment (H - I) (136), mais dans les deux études, les fragments L - C" et H - I contiennent de nombreuses coupures internes : ainsi le fragment H - I se décompose en cinq fragments de 20 à 40 000 daltons. Le fragment H" - M que nous avons purifié semble être une molécule intacte à 50% (figure 35) et il n'est pas exclu que certaines structures absentes dans les fragments L - C" ou H - I soient nécessaires au site d'interaction avec la protéine S20. Nous ne sommes pas certains par ailleurs d'avoir mis 1,2 équivalent de la protéine S20 par fragment H" - M puisque cette dernière est identique à L26, et que S20 + L26 ne sont présentes qu'à raison d'un exemplaire par ribosome 70S. Cette protéine est donc fractionnaire sur chacune des sous-unités 30S et 50S (c.f. page 12.). Il ne nous semble pas déraisonnable de penser que le fragment H"-M, long d'environ 250 nucléotides et commençant approximativement à 90 nucléotides de l'extrémité 5' de l'ARN 16S contienne au moins une partie des sites d'interaction des protéines S4 et S20 (212).

CONCLUSION

Les résultats préliminaires obtenus sur la localisation d'une partie des sites d'interaction des protéines S4 et S20 avec l'ARN 16S n'ont pas pu être complétés par des mesures stoichiométriques sur la formation du complexe ARN : H" - M - protéines (S4 + S20). La difficulté de purifier les quantités suffisantes de fragments homogènes d'ARN intacts et qui contiennent des sites d'interaction avec les protéines ainsi que les très faibles rendements que nous obtenions dans la récupération de la radioactivité après séparation en 2 dimensions des protéines ribosomiques ont rendu impossibles les mesures stoichiométriques nécessaires pour continuer cette étude de la localisation des sites d'interaction des protéines ribosomiques le long de la molécule d'ARN 16S.

T R O I S I E M E P A R T I E

CONTRIBUTION A L'ETUDE DE LA TOPOLOGIE DES RIBOSOMES PAR PONTAGES ENTRE PROTEINES DES SOUS-UNITES 30S OU 50S A L'AIDE DE REACTIFS BIFONCTIONNELS BISIMIDO-ESTERS DE DIFFERENTES LONGUEURS

C H A P I T R E I

Effet de l'action de réactifs bifonctionnels sur les profils de migration électrophorétique en deux dimensions des protéines des sous-unités 30S et 50S.

INTRODUCTION

Les réactifs biforctionnels se sont révélés d'une grande utilité dans l'étude des relations de voisinage entre protéines ribosomiques (168-178). Un certain nombre de réactifs bifonctionnels ont été utilisés dans ces diverses études. Notre travail a été poursuivi à l'aide du diméthyl succinimidate, adipimidate, subérimidate, et sébacimidate ; il nous a semblé que ces bisimidoesters possédaient un ensemble de caractéristiques permettant une approche fructueuse à l'étude de la topographie du ribosome. En effet, en milieu aqueux et dans des conditions de pH qui ne sont pas dénaturantes pour les ribosomes, ces composés réagissent rapidement et uniquement avec des groupes aminés libres dans les protéines. De plus, ils sont faciles à synthétiser et la distance maximale entre leurs deux groupes imidate varie de 4 à 12 A° selon le réactif considéré. Cependant, le principal intérêt de ces bisimidoesters réside dans la possibilité que nous avons de détruire le pontage produit par leur action, ceci dans des conditions qui ne détériorent pas trop les protéines pontées entre elles. Par ailleurs, il a été prouvé dans une expérience de reconstitution que deux protéines ribosomiques S5 et S8 pontées entre elles avec le diméthyl adipimidate et mélangées avec le reste des protéines ribosomiques 30S pouvaient en présence d'ARN 16S former un ribosome 30S actif *in vitro* pour synthétiser de la polyphénylalanine en présence de poly U (213). Les couples déjà identifiés de protéines ribosomiques pontées entre elles indiquent des voisinages de protéines compatibles avec la carte d'assemblage du ribosome 30S (128) et aussi avec les résultats des études faites sur

les protéines isolées de fragments de ribosomes (163).

L'ensemble de ces arguments nous a convaincu que les produits de pontage obtenus à l'aide des bisimidoesters que nous avons utilisés ne représentent sans doute pas des artefacts créés par une modification de la structure du ribosome en présence du réactif bifonctionnel. C'est en collaboration avec A. Expert-Bezançon et M. Milet que nous avons entrepris une étude des produits de pontage obtenus par l'action des diméthyl succinimidate, adipimidate, subérimidate et sébacimidate. Il nous a fallu fabriquer un appareillage miniaturisé pour l'électrophorèse en deux dimensions des protéines et des produits de pontage sur plaque de polyacrylamide de faible épaisseur, permettant ainsi le séchage et l'autoradiographie des gels. Nous avons également modifié des techniques décrites de préparations de l'échantillon de départ afin de pouvoir utiliser de très faibles volumes. Ces techniques ont permis de procéder à l'étude simultanée de nombreux échantillons, utilisant de très faibles quantités de protéines, de séparer et de mettre en évidence un grand nombre de complexes qui n'avaient pu être détectés par des électrophorèse en une dimension ou des chromatographies sur résines échangeuses d'ions.

I - MATERIELS ET METHODES

A) Préparation de sous-unités ribosomiques

Les sous-unités ribosomiques sont séparées en présence de 10^{-2}M de $MgCl_2$ et 0,4 M NaCl sur gradient de sucrose par centrifugation sur

rotor zonal comme les préparations de sous-unités froides (c.f. page 38) ou par centrifugation avec un rotor SW 25.1 (18 heures à 18 000 rpm) lorsqu'il s'agit de ribosomes 70S marqués au ^{35}S dans les conditions déjà décrites (173). Nous savons que dans ces conditions d'isolement, les ribosomes ne perdent pas leur activité biologique pour la synthèse *in vitro* de lysozyme (127).

B) Préparation et conditions d'utilisation de réactifs bifonctionnels

Les diméthyl succinimidate, adipimidate, subérimidate, et sébacimidate sont préparés d'après la méthode décrite (214), à partir de succinonitrile, adiponitrile, subéronitrile et sébaconitrile. Dans nos conditions habituelles, nous utilisons une concentration de ribosomes de 10 DO à 260 nm par millilitre en solution dans le tampon triéthanolamine 0,1 M pH 7,2, 0,01 M $MgCl_2$, 0,05 M de KCl, 0,006 M de β-mercaptoéthanol. La réaction de pontage se fait à pH 8,2. 60 µl de triéthanolamine 2 M non neutralisée contenant 0,05 M KCl, 0,01 M $MgCl_2$, 0,06 M β-mercaptoéthanol est ajouté par ml de solution de ribosomes. Dans ces conditions, le pH devient 8,2. Le réactif est utilisé en excès molaire de 100 à 1000 par rapport au nombre de groupements NH_2 disponibles dans les protéines ribosomiques. Une solution de 4 mg de réactif dans 85 µl de triéthanolamine 0,1 M pH 7,2, 0,01 M $MgCl_2$ et 14 µl de KOH 2N préparée immédiatement avant la réaction est mélangée avec 10 DO de ribosomes pH 8,2. Après une incubation de 90 minutes à 25°C, la réaction est arrêtée et les ribosomes sont précipités par addition d'éthanol (0,6 volumes). Le précipité est ensuite centrifugé et les ribosomes sont redissous dans le tampon de départ.

C) *Préparation des protéines ribosomiques pour l'étude sur plaque en deux dimensions*

L'extraction des protéines est faite par traitement à l'acide acétique suivi d'une précipitation à l'acétone comme nous l'avons décrit (c.f. page 39). Les protéines sont redissoutes dans l'urée 8 M et précipitées une nouvelle fois par addition de 5 volumes d'acétone afin d'éliminer toute trace d'acide acétique. Chaque échantillon (300 à 500 µg) de protéines ribosomiques 30S ou 50S est redissous dans 10 µl d'une solution fraîche 8 M urée, 0,1 M β-mercaptoéthanol, 1‰ de bleu de bromophénol et il est ensuite incubé 5 minutes à 37°C avant d'être déposé dans le puits d'échantillon de la première dimension d'électrophorèse. Cette incubation en présence d'une forte concentration de β-mercaptoéthanol évite une agrégation des protéines ribosomiques par oxydation des groupements thiols.

D) *Electrophorèse en deux dimensions*

1. - *Construction de l'appareil*

Afin de pouvoir entreprendre un grand nombre d'analyses simultanées avec des quantités faibles d'échantillon, nous avons construit les appareils d'électrophorèse en deux dimensions en se basant sur l'appareil décrit par Elson (215, 216). Cependant, un certain nombre de modifications ont été nécessaires afin de pouvoir construire facilement et à un prix de revient très bas ces appareils. De plus, nous pouvons utiliser le même appareillage pour couler des plaques

de gel de 1 ou 2 mm d'épaisseur. La construction de ces appareils consiste en l'assemblage d'éléments parallélépipédiques de plexiglass dont les mesures et l'ordre d'assemblage ont été précisés ailleurs (217). Les figures 38 a et b illustrent un appareil utilisé pour les premières dimensions, et pour une deuxième dimension.

2.- *Conditions d'électrophorèse*

a) première dimension - Les tampons et le gel (4% d'acrylamide pH 8,6) sont les mêmes que ceux utilisés dans la méthode originale (209) après les modifications décrites (218). Le gel de la dimension est coulé, l'appareil étant horizontal, les ponts verticaux servent de connexion pour le passage du courant et sont également remplis avec cette solution de gel. Un peigne permet de mouler les puits d'échantillon au milieu de chaque gel de première dimension et il est mis en place avant la polymérisation du gel. Afin d'éviter des fuites lors du coulage de cette première dimension, la base de chacun des ponts de connexion est rendue étanche par une feuille de polyéthylène maintenue avec de la graisse de silicone. La polymérisation dure à peu près 20 minutes à température ambiante. Une préélectrophorèse de 1 heure sous 100 volts permet d'éliminer le persulfate d'ammonium en excès ; le moule des puits d'échantillon est maintenu en place. La dépose de l'échantillon protéique se fait après avoir rempli le puits de départ avec de l'eau distillée ; l'échantillon est dans une solution plus dense que l'eau et se dépose dans le fond du puits. Pour des plaques de 1 mm d'épaisseur le volume d'échantillon est de 10 µl. Il est de 20 µl pour des plaques de 2 mm d'épaisseur. L'électrophorèse a lieu à 4°C et commence sous

un champ de 1 volt par centimètre, pendant 1 heure. Nous diminuons ainsi l'importance de traînées de protéines parfois présentes dans la première dimension. Le champ est ensuite augmenté à 5 volts/cm (100 volts aux bornes du générateur) et pendant l'électrophorèse, le tampon est recyclé d'une électrode à l'autre au moyen d'une pompe (récemment nous avons remarqué que ce recyclage était inutile). L'électrophorèse est arrêtée lorsque le bleu de bromophénol a migré jusqu'à la moitié de la hauteur du gel dans le pont de connexion (après une électrophorèse d'environ 16 heures).

b) dialyse du gel - la dialyse de la première dimension a été effectuée d'abord pendant 2 fois 45 minutes dans 25 ml de tampon de dialyse (215). Une étude de la cinétique d'élution des protéines en fonction du temps de dialyse nous a conduit à dialyser pendant 2 fois 5 minutes.

c) deuxième dimension -

- préparation des ponts de gel servant de connexion électrique -

Les ponts de gel qui permettent le passage du courant électrique sont remplis d'une solution de gel 10% acrylamide, 0,5 % bisacrylamide dans le tampon d'électrophorèse de deuxième dimension (209), 0,1 % TEMED et 2,5 % d'une solution contenant 8 mg de riboflavine dissoute dans 24 ml d'eau bouillante. La polymérisation catalysée par la riboflavine à la lumière nous permet d'obtenir des gels qui adhèrent mieux sur le plexiglass. Cette polymérisation dure 15 minutes à la lumière du jour. Après une préélectrophorèse de 1 heure sous un champ de 10 v/cm, les appareils sont prêts pour le coulage des plaques de gel de la deuxième dimension.

- Préparation des plaques de deuxième dimension

Après dialyse les gels de première dimension (B figure 38 b) déposés horizontalement et parallèlement aux ponts de gel (A, figure 38b) à 2 cm environ de la partie supérieure de l'un des ponts (la partie inférieure plonge dans le tampon). L e dessus de l'appareil est recouvert d'une plaque de plexiglass (C, figure 38b) que l'on maintient en position à l'aide de pinces à dessin. De cette manière, le gel de première dimension est maintenu en position et la plaque est coulée dans le moule ainsi formé sur trois côtés. Le gel de deuxième dimension est identique à celui utilisé par Kaltschmidt et Wittmann lorsque nous voulons séparer les protéines ribosomiques. Pour séparer les complexes, nous utilisons une concentration de bisacrylamide de 0,25% soit moitié moins que précédemment. Après la polymérisation du gel (20 minutes à température ambiante) les petits réservoirs (D, figure 38b) créés au-dessus des gels de connexion sont remplis de tampon de deuxième dimension (209) du côté de la cathode et de tampon de deuxième dimension contenant 4×10^{-2}M de cystéamine près du gel de première dimension du côté de l'anode. La cystéamine inhibe une oxydation des protéines par le persulfate d'ammonium présent dans le gel. L'électrophorèse commence après un dépôt de 500 µl de pyronine Y à 1% dans de l'urée 8 M, le long du gel de première dimension sous un champ électrique de 1 v/cm que l'on augmente à 10 v/cm 2 heures plus tard. L'électrophorèse dure environ 16 heures ; elle est arrêtée lorsque la pyronine Y a atteint l'extrémité du gel.

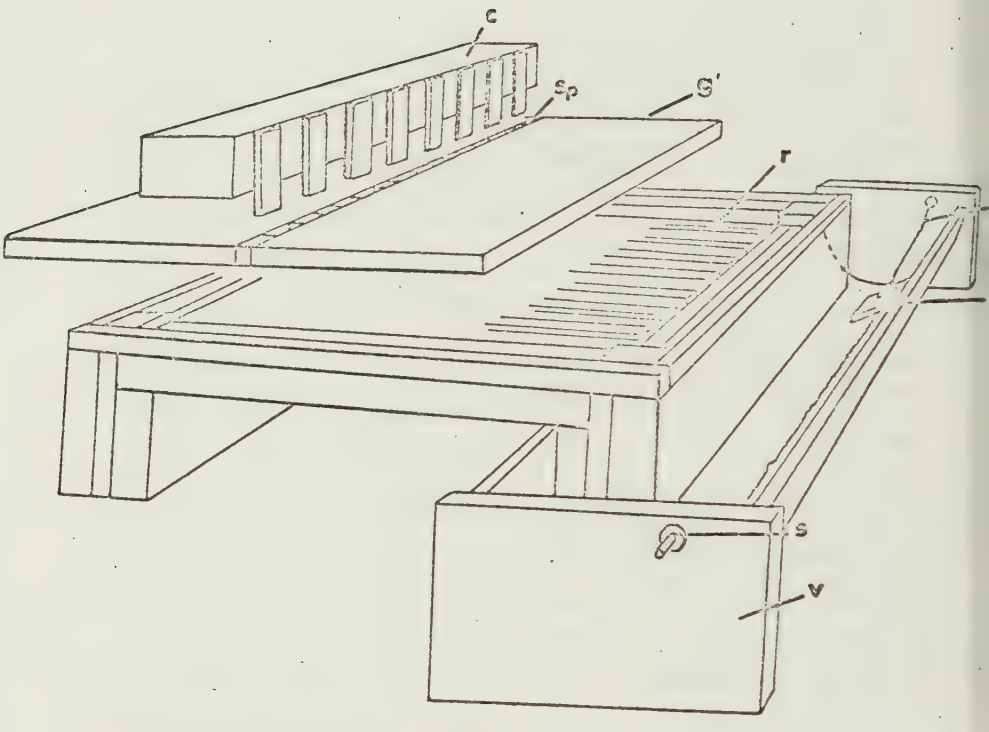


FIGURE 38a- Schéma de l'appareillage pour l'électrophorèse de huit premières dimensions

C : moule pour puits d'échantillon

g': plaque supérieure recouvrant le gel

Sp: passage du moule à travers g'

r : rigole servant de moule pour couler le première dimension

v : bac d'électrode

Pt: fil de platine 0,2 mm de diamètre

m : guide pour le fil de platine

s : vis de serrage du fil de platine et connexion électrique

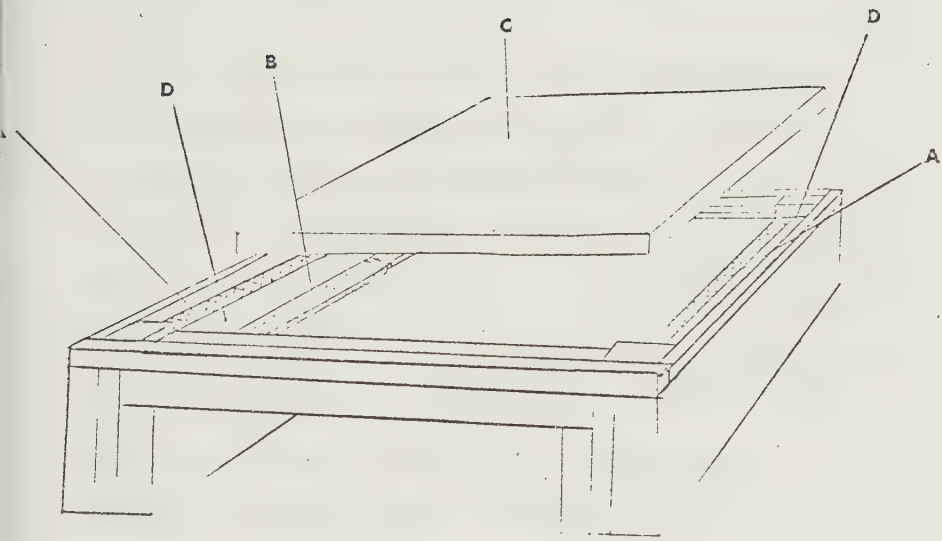


FIGURE 38b - Schéma de l'appareillage pour l'électrophorèse d'une seconde dimension

A : gel du pont

B : gel de première dimension

C : couvercle

D : petits réservoirs de tampons

E) *Coloration et séchage des plaques*

Les plaques sont colorées au "coomassie brilliant blue R" dans les conditions déjà décrites (218). Les fortes concentrations d'acrylamide et de bisacrylamide utilisées dans la deuxième dimension rendent difficiles le séchage des plaques de gel. Afin d'éviter des craquelures nous incubons nos plaques pendant 30 minutes dans une solution aqueuse contenant 65% de méthanol et 2% d'acide acétique. Les plaques sont ensuite séchées sous vide (219) (0,05 à 0,1 mm de Mg) en 2 heures.

F) *Autoradiographie*

On utilise les films Kodak Royal RP/S Xomat, qui permettent la détection de taches de protéines contenant 5 000 cpm en S^{35} après une exposition de huit jours.

G) *Comptage de la radioactivité*

La mesure de la radioactivité se fait après découpage à la lame de rasoir de morceaux de la plaque de gel, hydrolyse par de l'eau oxygénée à 110 volumes une nuit à 55°C, et comptage en scintillation liquide après addition de triton-toluène-PPO-POPOP.

II - RESULTATS

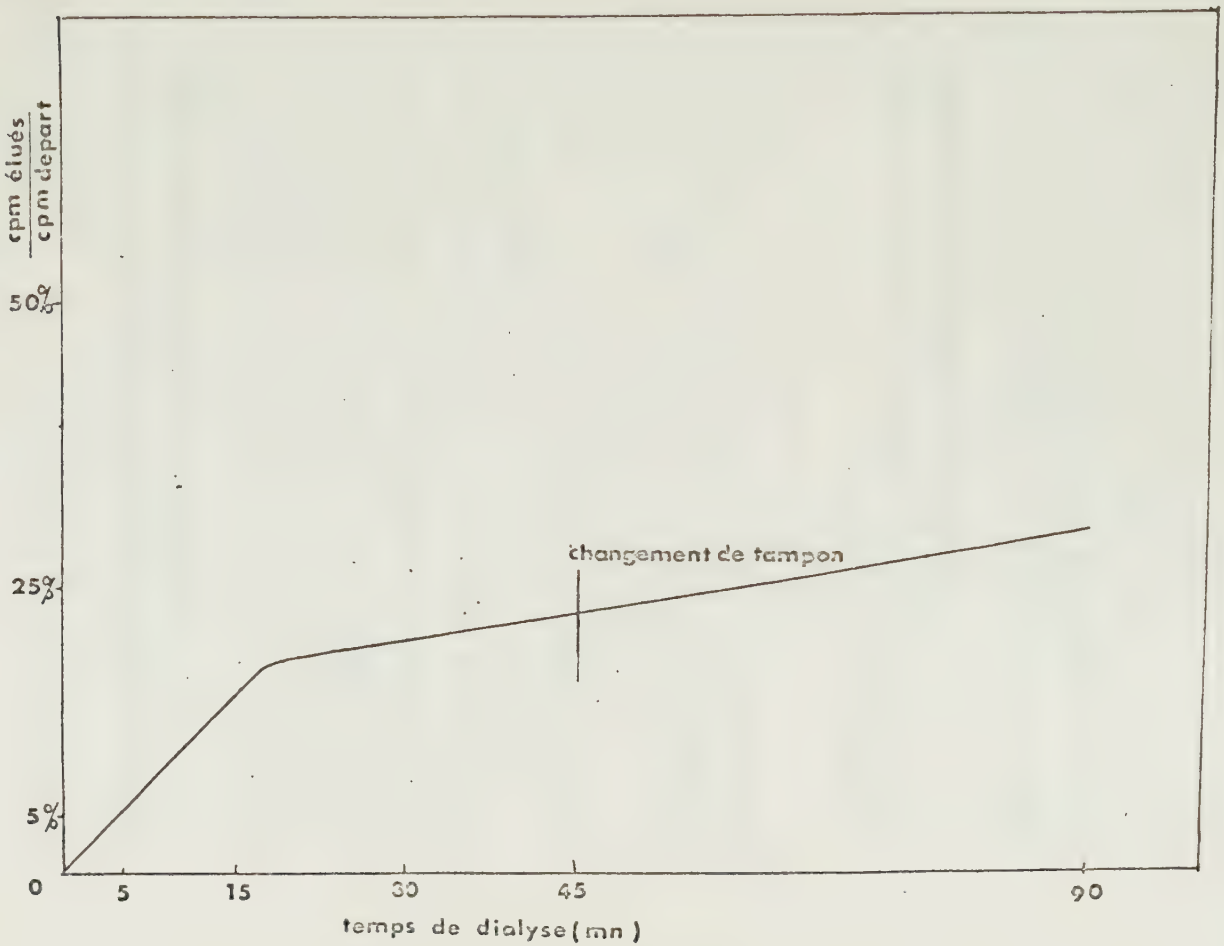
A) Etude de la perte en protéines perdant les différentes étapes de l'électrophorèse sur plaque en deux dimensions

Afin de procéder à des mesures stoichiométriques sur les protéines ribosomiques présentes dans nos complexes, nous nous sommes efforcés, à l'aide de protéines marquées au ^{35}S d'évaluer les pertes en protéines au cours des différentes étapes de l'électrophorèse. L'échantillon protéique n'étant pas polymérisé au départ de la première dimension, les pertes devaient être beaucoup moins importantes que dans la technique classique. Les moyennes des résultats obtenus dans quatre électrophorèses sont présentées dans le tableau IV. La figure 39 illustre la cinétique d'élution des protéines ribosomiques pendant la dialyse. Dans les temps de dialyse (de 1 heure à 2 heures) habituellement utilisés (209, 215, 216), nous observons une perte minimale de 30% du matériel de départ.

B) Détermination du nombre de copies de chaque protéine ribosomique présente dans nos préparations de ribosomes 50S

Nos sous-unités ribosomiques étant obtenues par dissociation de ribosomes 70S en présence de 0,4 M NaCl et 10^{-2}M $MgCl_2$, il nous a semblé intéressant de déterminer le nombre de copies de chaque protéine ribosomique dans nos préparations. Diverses études ont été publiées (114-120), les résultats variant selon le mode de préparation des ribosomes. En connaissant le nombre d'atomes du soufre présents

Pourcentage de perte par élution des protéines S^{35}



dans chaque protéine, on peut déterminer par rapport à une protéine de référence (L19 dans nos mesures) le nombre de molécules de chaque protéine présente dans la préparation de départ en comptant la radioactivité des protéines après séparation sur plaque. Il faut supposer que le marquage en soufre^{35} est uniforme et que les pertes lors des différentes étapes de l'électrophorèse sont les mêmes pour toutes les protéines. Il n'est pas possible de procéder aussi simplement avec l'appareillage décrit par Kaltschmidt et Wittmann (209) puisqu'un pourcentage important des protéines ribosomiques reste dans le gel d'échantillon de départ et que ce pourcentage variable pour chaque protéine a dû être calculé par extrapolation de nombreuses mesures (116). Le tableau V illustre les résultats obtenus dans 4 séparations sur plaques de protéines ribosomiques provenant de 3 marquages ^{35}S et de préparations indépendantes de ribosomes 50S. Les résultats sont comparés à ceux publiés pour la souche d'*E.coli B*. Une bonne correspondance entre les deux mesures existe pour les protéines L3, L8 + L9, L10, L11, L15, L18, L19, L20, L21, L29 ; Par contre, nous trouvons plus de copies de L2, L6, L13, L14, L17, et moins de copies de L7 +L12, L16, L24.

Dans le cas des autres protéines, nos mesures varient trop d'une préparation à l'autre pour que nos valeurs soient significatives. Les méthodes de préparation des sous-unités ribosomiques diffèrent d'un laboratoire à l'autre et une estimation correcte du nombre de copies de chaque protéine ribosomique présente dans les sous-unités ribosomiques *in vitro* est délicate.

TABLEAU IV

Bilan des pertes en protéines pendant les différentes étapes de l'électrophorèse en deux dimensions

Radioactivité	perte par rapport à la radioactivité de départ
restant dans le puits d'échantillon	5% à 10 %
perte pendant la dialyse (2 fois 5 minutes)	$<$10%
restant dans le gel première dimension après migration dans la deuxième dimension	$<$ 5%
radioactivité récupérée après hydrolyse totale du gel de deuxième dimension	# 80%

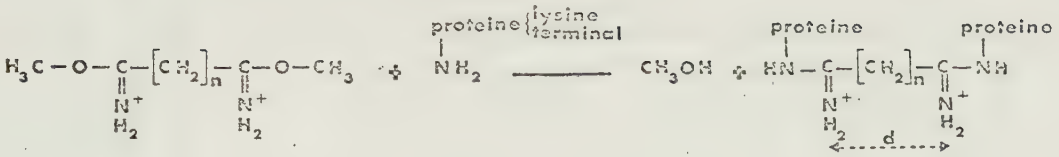
PROTEINES		1e PREPARATION					
uméro	Nombre de soufre	plaque 1	plaque 2	plaque 3	plaque 4		(116)
1	5 à 6	1,3-1,5	1,2-1,4	1,3-1,5	1,6-2	1,3-1,6	1,1
2	9	1,8	2	2	1,2	1,7	0,9
3	4 5	1,3-1,6	1,9-2,4	1,3-1,7	1,2-1,6	1,4-1,8	1,4
4	5	2,1	2,2	2,25	2,2	2,2	0,9
5	6-7	0,8-0,9	0,8-0,9	0,9-1	1-1,2	0,9-1	1,4-1,8
6	7-8	0,2-0,3	0,2-0,3	0,2-0,25	0,4-0,5	0,2-0,3	1,15
7+12	3+3	0,3+0,8	0,12+0,12	0,12+0,12	0,3+0,4	0,7	1,7+0,3
8 } 9 }	5	1,8	2	2,2	2	1,9	1,4
10	6-7	1,0-1,2	1,2-1,4	0,3-0,4	0,9-1,1	1-1,2(3)+(4)	0,95
11	7	1,5	1,5	0,9	1,3	1,3	1,15
13	3	2,8	3	2,2	1,4	2,3	1,4
14	6	1,5	1,2	1,1	1,2	1,2	0,2
15	3	0,8	1	0,5	0,8	0,8	1 à 1,55
16	5	0,3	0,5	0,12	0,4	0,4 (4)	0,8
17	6	2,1	2,1	1,9	1,5	2	1,2
18	2	2,3	2,0	1,3	1,1	1,7	2,18
19	3	1	1	1	1	1,1	1,05
20	2	0	0,12	0	0,5	?	F
21	2	0,5	1,2	0,3	1	/(3)	0,85
22	2-3	1,4-2,3	1,4-2,3	1,4-2	1-1,6	1,4-2	1,65-2
23	2	1,3	0,4	0,5	0,8	0,8	1,2
24	1	0	0	0	0,25	?	1,6
25	3	1,1	1,2	0,6	0,8	1	1,4
26+28	3+3	0,3	1	0,18	0,3	0,3	0,65
27	1	1,5	1,5	0,7	0,5		0,75
29	1-2	1à2	1-2	1-2	0,5-1	1-2	1,1
30	2-3						
31	?						
32	1 ?						
33	2 ?						
34	?						

TABLEAU V

C) Pontage de ribosomes

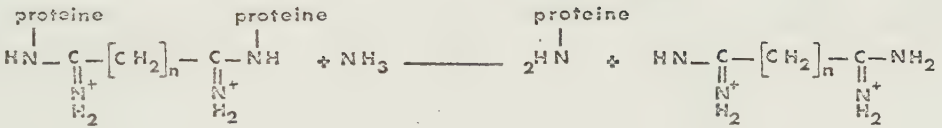
Les réaction des bisimidoesters avec les protéines sont illustrées dans la figure 40. La formation d'un pont entre deux groupements aminés libres peut se faire à l'intérieur d'une même chaîne polypeptidique ou entre deux protéines, un seul groupe réactif peut former une liaison avec une protéine, l'autre groupe étant hydrolysé, la charge de la protéine est ainsi modifiée. Les migrations électrophorétiques avec des protéines ribosomiques 30S et 50S pontées sont illustrées dans les figures 41 et 42 où les résultats de l'action du d iméthyl succinimidate, adipimidate, subérimidate, et sébacimidate sont comparés. Les figures 43 et 44 montrent le profil de migration des protéines 30S et 50S non pontées. Après pontage, les migrations électrophorétiques sont très modifiées, nous observons un léger déplacement et un allongement des taches du côté de la cathode de la première dimension, ainsi que l'apparition de nouvelles taches dont le nombre croit avec la taille du réactif utilisé. Dans la partie supérieure de la plaque, les zones colorées nouvelles sont visibles ; des protéines 30S ou 50S marquées au soufre^{35} ont été mélangées avec des protéines pontées en quantités trop faibles pour être visibles par coloration ; après électrophorèse, la migration des protéines S^{35} est détectée par autoradiographie et comparée à celle des protéines colorées. L'emplacement des protéines ^{35}S a été dessiné d'après l'autoradiographie sur chaque photographie présente dans les figures 41 et 42, à l'exception des profils de migration des protéines 30S et 50S obtenus après traitement par le sébacimidate.

Bis Imido esters



n = 2	Succinimidate	d = 3.78 Å
n = 4	Adipimidate	d = 6.3 Å
n = 6	Suberimidate	d = 8.8 Å
n = 8	Sebacimidate	d = 11.3 Å

Ammonolyse



Hydrolyse

FIGURE 41

FIGURE 41 - Répartition des zones de coloration de protéines 30
après réaction de pontage avec le D.M. succinimidate, le D.M. d
pimidate le D.M. subérimidate et le D.M. sébacimidate, et élec
trophorèse en deux dimensions.
Des protéines de ribosomes 30S marqués au S^{35} ont été mélangées
à l'échantillon et détectées par autoradiographie. L'emplacemen
de ces protéines est dessiné.

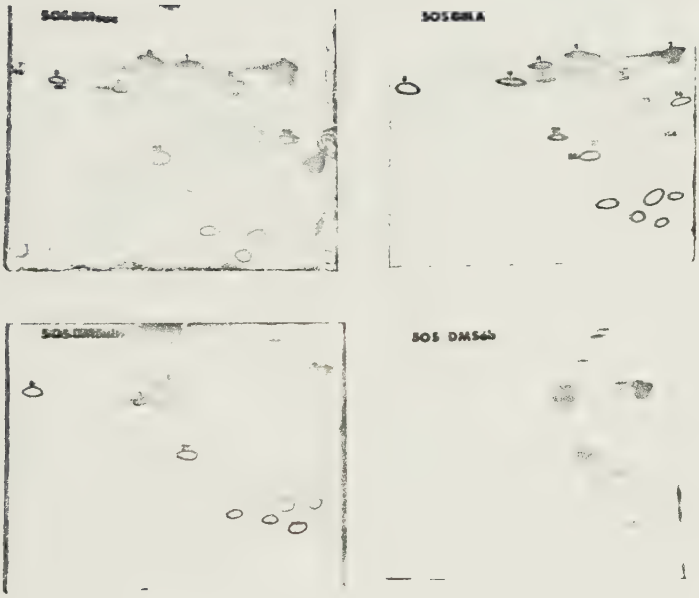


FIGURE 42 - Répartition des zones de coloration de protéines 50S après réaction de pontage avec le D.M. succinimidate, le D.M. adipimidate, le D.M. subérimidate, et le D.M. sébacimidate, et électrophorèse en deux dimensions.

Des protéines de ribosomes 50S marqués au S^{35} ont été mélangées à l'échantillon et détectées par autoradiographie. L'emplacement de ces protéines est dessiné.

FIGURE 43 - Profil normal de migration des protéines 30S par électrophorèse en deux dimensions.

a) autoradiographie

b) coloration

FIGURE 44- Profil normal de migration des protéines SOS par électrophorèse en deux dimensions.

Le pontage avec le DM Succinimidate fait apparaître nettement dans les sous-unités 30S cinq nouvelles taches (A, G, X, K, L) qui migrent vers des positions suffisamment distinctes pour nous permettre de penser qu'il s'agit de produits nouveaux, puisque l'effet de pontages intramoléculaires ou de modifications par l'action d'un seul groupe réactif avec hydrolyse de l'autre en formant un méthylester serait moins important sur la migration d'une protéine. Trois nouvelles taches (A, B, C) sont nettement visibles dans les sous-unités ribosomiques 50S, d'autres taches sont trop faiblement colorées pour être analysées.

Le pontage par le DM adipimidate des sous-unités 30S fait apparaître une dizaine de nouvelles colorations et le pontage par le DM Subérimidate un nombre encore plus important de produits de pontage. D'après leurs positions électrophorétiques, un certain nombre de ces produits migrent aux mêmes emplacements que ceux créés par le DM adipimidate. La nomenclature utilisée est dessinée dans la figure 46, d'après l'autoradiographie d'une plaque préparative.

Les produits de pontage obtenus par l'action du DM adipimidate et du DM subérimidate sur les sous-unités ribosomiques 50S semblent identiques, mais le rendement de cette réaction (quantité de protéines pontées sur quantité de protéines présentes dans le mélange réactionnel) est moins important avec le DM Adipimidate.

L'autoradiographie d'une plaque préparative et la nomenclature utilisée pour les produits de pontage des ribosomes 50S avec le DM subérimidate sont présentées dans la figure 46. Environ une vingtaine de

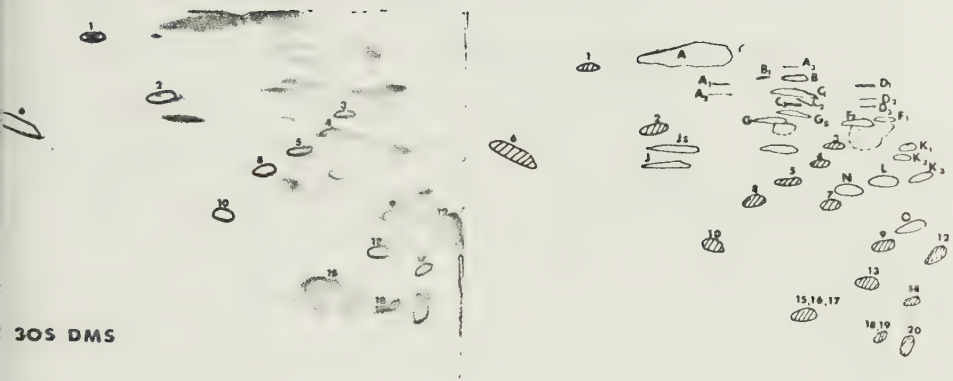


FIGURE 45 - Schéma de migration de protéines 30S après pontage par le D.M. subérimidate d'après la coloration d'une plaque préparative. Nomenclature utilisée pour les produits nouveaux.

produits sont assez nettement détectables, bien que le contour de la coloration soit mal délimité pour certains d'entre eux (voir figure 42). Cependant, les pontages semblent identiques d'une préparation à l'autre. Le DM Sébacimidate est d'un maniement plus délicat car une fraction de ce réactif précipite pendant l'incubation avec les sous-unités ribosomiques ; par ailleurs, nous n'avons pas détecté la formation de nouveaux complexes avec le DM Sébacimidate.

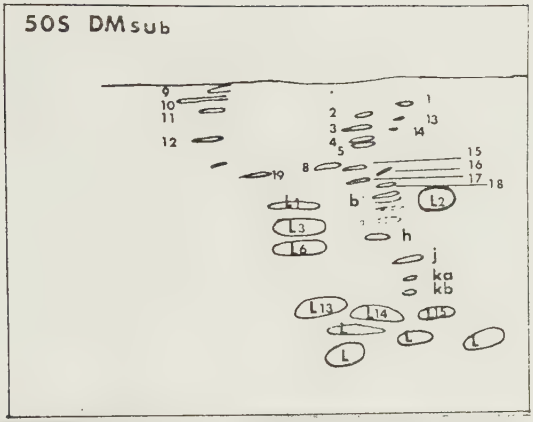


FIGURE 46 - Schéma de migration de protéines 50S après pontage par le D.M. subérimidate, d'après l'autoradiographie d'une plaque preparative. Nomenclature utilisée pour les produits nouveaux.

CHAPITRE II

Après avoir mis en évidence et séparé sur plaque en deux dimensions un certain nombre de produits de pontage, nous avons isolé et caractérisé quelques-uns de ces complexes. Il nous a fallu éluer et récupérer les protéines après séchage et coloration des plaques et préciser les conditions d'ammonolyse afin de pouvoir identifier les produits pontés.

I - MATERIELS ET METHODES

A) Elution et récupération des complexes

Nous séparons par électrophorèse sur plaque les protéines et les produits de pontage de 17 00 à 260 nm de ribosomes 30S ^{35}S ou de 24 00 à 260 nm de ribosomes 50S ^{35}S (correspondant à ces radioactivités variant de 20 x 10^6 à 60 x 10^6 cpm selon les préparations de ribosomes). Les plaques sont colorées et séchées et une autoradiographie (2 à 6 heures) montre une séparation qui est rigoureusement superposable à celle que nous obtenons par coloration. Les taches sont découpées au scalpel dans la plaque de gel séché, et la radioactivité est éluée après 48 heures d'incubation dans un millilitre de tampon 0,01 M triéthanolamine pH 7,2, 0,5 % de SDS et 0,01 M de β-mercaptoéthanol. Dans ces conditions, le morceau de gel est réhydraté et environ 90% de la radioactivité est récupérée. Des protéines froides en solution dans ce même tampon sont ajoutées aux éluats (300 µg de protéines ribosomiques 30S ou 400 µg de protéines ribosomiques 50S) et le mélange est laissé à précipiter la nuit à -20°C après addition de 5 volumes d'acétone. Les protéines sont ensuite centrifugées à 1500 g pendant 5 minutes, et les culots séchés puis redissous dans 200 µl de SDS 10%,

10^{-1}M de β-mercaptoéthanol. Afin de déterminer le poids moléculaire de l'échantillon un aliquot de 1000 à 2000 cpm est prélevé et électrophorésé sur gel de polyacrylamide en présence de SDS. Le reste de la préparation est ammonolysé.

B) Détermination des poids moléculaires de certains complexes par électrophorèse sur gel de polyacrylamide en présence de SDS

L'électrophorèse simultanée de treize échantillons a lieu sur plaques de gels de 1 mm d'épaisseur, dans les conditions déjà décrites (220). De l'hémoglobine monomère pontée par le diméthyl subérimidate sert d'étalonnage des poids moléculaires. Après électrophorèse, la plaque de gel est colorée, séchée et mise à autoradiographier pendant 1 semaine.

C) Destruction du pontage par ammonolyse

Aux protéines en solution dans 200 µl de SDS 10%, 5 x 10^{-2}M β-mercaptoéthanol, nous ajoutons 800 µl d'une solution 6,5 M NH_4OH, 1 M CH_3COOH. Après une incubation de 18 heures à 30°C, nous précipitons les protéines par addition de 5 ml d'acétone. Il y a formation de deux phases mais les protéines ribosomiques sont récupérées dans le culot après une centrifugation à 1500 g. Les échantillons sont mis en solution dans de l'urée 8 M et précipités une nouvelle fois afin d'éliminer toutes traces d'ammoniaque avant d'être analysés par électrophorèse sur plaque en deux dimensions.

D) *Analyse par électrophorèse en deux dimensions des produits d'ammonolyse*

Les protéines récupérées après l'ammonolyse sont séparées par électrophorèse en deux dimensions et les plaques de gel après coloration et séchage sont autoradiographiées. Les produits réactifs sont localisés et identifiés d'après l'autoradiographie et la coloration des protéines froides.

Les protéines ribosomiques entraîneuses, visibles en coloration, ainsi que les produits détectés par autoradiographie sont découpés et élués sur la plaque de gel et la radioactivité est mesurée nous permettant ainsi de calculer la stoichiométrie des protéines présentes dans les complexes analysés.

II - RESULTATS

A) *Cinétique d'ammonolyse*

Les conditions d'ammonolyse utilisées habituellement (214) ne nous permettaient pas d'obtenir un rendement suffisant pour poursuivre l'identification des protéines ribosomiques après ammonolyse, et c'est pour cette raison que l'identification de certains couples de protéines n'a pu être réalisée dans d'autres travaux qu'à l'aide d'anticorps purifiés de chacune des protéines de la sous-unité ribosomique 30S, testés individuellement pour leur réaction immunologique avec les protéines présentes dans le produit de pontage étudié. Ce faible rendement de l'ammonolyse semble dû à une précipitation des

protéines. Nous avons augmenté la concentration de SDS dans le mélange réactionnel afin de maintenir les protéines ribosomiques en solution pendant l'incubation et une cinétique de l'ammonolyse a pu être étudiée dans ces conditions avec un complexe bien défini et identifié : le complexe G obtenu après pontage des sous-unités 30S ^{35}S par le diméthyl subérimidate ou adipimidate. L'ammonolyse de ce complexe a été suivie pendant une incubation de 31 heures à 40°C. Après une séparation électrophorétique des produits ainsi obtenus, les plaques de gel ont été ensuite autoradiographiées et la radioactivité présente dans le complexe et dans les produits d'ammonolyse a été comptée. Les résultats sont présentés dans le tableau V. Après 9 heures d'incubation à 40°C, 76% du complexe a été ammonolysé et une incubation plus longue n'améliore pas ce résultat ; par ailleurs, une modification des propriétés électrophorétiques des produits d'ammonolyse est observée si l'incubation est prolongée trop longtemps au-delà de 15 heures à 40°C. Pour des raisons de commodité, nous utilisons une incubation de 18 heures à 30°C équivalente approximativement aux résultats obtenus après 9 heures à 40°C, et dans ces conditions, nous obtenons environ 75% d'ammonolyse et très peu de modifications du comportement électrophorétique des protéines.

B) *Analyse de certains produits de pontage de la sous-unité ribosomique 30S par le DM subérimidate*

Les protéines d'une préparation de ribosomes 30S ^{35}S (130 x 10^6dpm, 600 DO à 260 nm) pontées par le DM subérimidate sont séparées par électrophorèse sur 4 plaques de gel et les complexes identiques dans chacune des plaques sont découpés et élués dans le même tube. Les résultats sont

TABLEAU V

Etude de la cinétique d'ammonolyse sur la tache G incubée à 40°C pendant 0, 3, 6, 9, 12, 15, 18, 21, 31 heures

Le rendement de la réaction est mesuré dans les produits d'ammonolyse en faisant le rapport de la radioactivité récupérée dans les produits de l'ammonolyse (S5 + S8) et la radioactivité récupérée dans la plaque (complexe G de départ + S5 + S8)

Les résultats sont normalisés à 10 000 cpm déposés au départ de la plaque.

temps d'ammonolyse (heures)	radioactivité comptée dans			rendement d'ammonolyse $\frac{\Sigma \text{ de cpm dans S5+S8}}{\Sigma \text{ de cpm dans S5+S8+G}}$
	G	S5 (cpm)	S8	
0	10 000	--	--	0%
3	6900	1700	1400	31%
6	4150	4500	1350	58%
9	2440	3500	4000	76%
12	2450	4450	3100	76%
15	2380	5400	2220	76%
18	2500	3100	4400	75%
21	1300	4350	4350	87%
31	3300	5300	1320	67%

TABLEAU VI

Radioactivité déposée : 130 x 10^6 cpm de ^{35}S

complexes élués	cpm élués	cpm après aminolyse	pourcentage de récupération	poids moléculaires (SDS)
J	230 000	41 000	18 %	27 000
I	40 000	13 000	30 %	26 000
G	530 000	213 000	40 %	34 000
F2	92 000	20 000	22 %	37 000
F1	188 000	60 000	31 %	35 000
D4	10 500			46 000 et 28 000
D3	11 000			51 000 + 49 000 + 2800
D2	10 500			trop impur
D1	31 000	5 800	18 %	53 000 + 45 000
C2	71 000	26 000	28 %	46 000
C1	104 000	31 000	30 %	46 000
B	88 000	22 000	25 %	59 000
A3	18 000	7 000	40 %	
A	12 000			
S4	520 000	153 000	30 %	28 000
L	200 000	50 000	20 %	28 000
K	8 000			34 000
K2	6 000			34 000 et 23 000
S5	72 000	53 000	75 %	20 000
N	128 000	24 000	18 %	24 000
O1	2 800			18 500
O2	2 000			

TABLEAU VII

Distribution des atomes de soufre dans les protéines 30S

Protéine	P.M. SDS x10^3 *Dzionara et coll.*	Méthionine *Kaltschmidt et coll.*	cystéine *Acharya et Moore*	*Kahan Held Nomura*	*Bakerdjieva Crichton*	nombre total de soufre
S1	65	10	1,26	1,75	1	11
S2	28,3	5,8	0,88	0,74	1	6
S3	28,2	3,7			0,9	4-5
S4	26,7	2,2	1	0,79	0,85	3
S5	19,6	3,6				4
S6	15,6	5,4				5-6
S7	22,7	3,3				3
S8	15,5	4,4	0,88	0,98	1	5
S9	16,2	2,1			+S11=0,9	2-3
S10	12,4	1,8				2
S11			2,1	1,73	+S9=0,9	2
S12	17,2	0,5	} 2,50	2,69	4	3-4
S13	14,9	1,6		0,95	1	2-3
S14	14	2,26	0,9	0,97	0,85	3
S15	12,5	1,44	(0,8)			1
S16	11,7	1				1
S17	10,9		2	1,74		2
S18	12,2	0	1	1,08	1,1	1
S19	13,1	2,2				2
S20	12	2,7				3
S21	12,2	0	0,6	1,04	2,15	1-2

présentés dans le tableau VI. Un échantillon de l'éluat est prélevé et compté afin de déterminer la radioactivité totale présente dans chacun des complexes. Pour permettre les études ultérieures, un minimum de 30 000 cpm est nécessaire dans l'éluat. En effet, des pertes de radioactivité très importantes ont lieu lors de la première précipitation à l'acétone après la réaction d'ammonolyse, le pourcentage de récupération étant rarement supérieur à 25-30%. Les poids moléculaires de ces complexes (tableau V) ont été estimés d'après leur mobilité en gel de SDS (autoradiographie, figure 48). Les produits d'ammonolyse des complexes B, C1, C2, G1, D1, I, F1 ont été séparés sur place et autoradiographiés. La figure 48 représente les résultats obtenus après autoradiographie de la plaque de protéines 30S contenant le complexe G ammonolysé. Trois taches sont nettement visibles et migrent aux positions des protéines S5, S8 et à la position originale du complexe G non ammonolysé. La distribution de la radioactivité pour l'ensemble des complexes étudiés est présentée dans les histogrammes des figures 49, 50, 51.

La radioactivité présente à l'emplacement du complexe initial est indiquée pour les complexes B et C. L'estimation du nombre d'atomes de soufre présent dans chaque protéine de la sous-unité 30S a été établie d'après les distributions de méthionine, les poids moléculaires et les réactions au N-éthylmaléimide, iodoacétamide et par aminoéthylation (107, 108, 221, 223). Les valeurs que nous utilisons sont présentées dans le tableau VII et sont indiquées dans les figures 49 et 50 sous les protéines présentes dans les complexes. Nous observons dans le complexe B trois protéines : S4, S5, S8 dont la radioactivité est nettement supérieure à celle du bruit de fond. La radioactivité d'un équi-

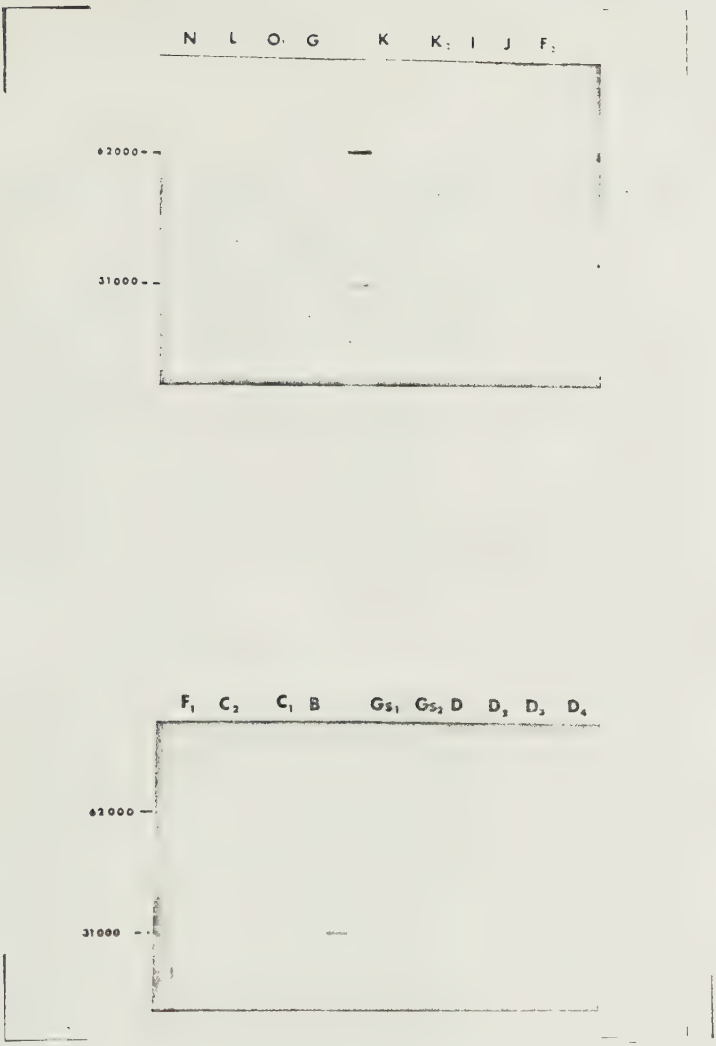
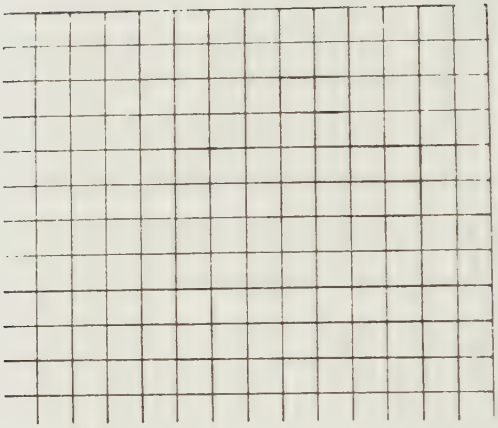


FIGURE 47 - Estimation des poids moléculaires en gel de SDS de complexes protéiques obtenus après pontage par le D.M. subérimidate de ribosome 30S S^{35}

Environ 2000 cpm par échantillon ont été déposés et électrophorésés (22C). L'autoradiographie a duré 8 jours. Nous avons utilisé de l'hémoglobine de forme monomère, dimère et quadrimère pour mesurer les poids moléculaires de chaque complexe.



30S DMA : Complexe G: S5 + S8

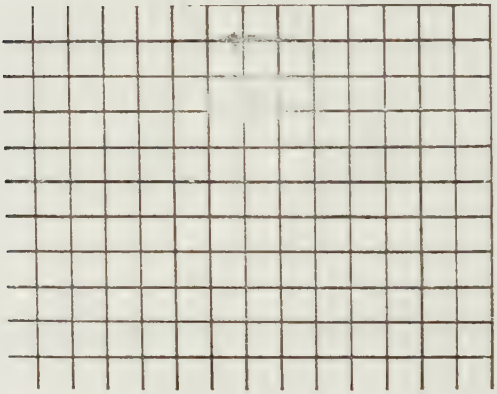


FIGURE 48 - Plaque et autoradiographie du complexe G

Electrophorèse en deux dimensions de protéines 30S froides

et des produits marqués au S^{35} obtenus après l'ammonolyse

du complexe G. Ces produits sont détectés par autoradiograp

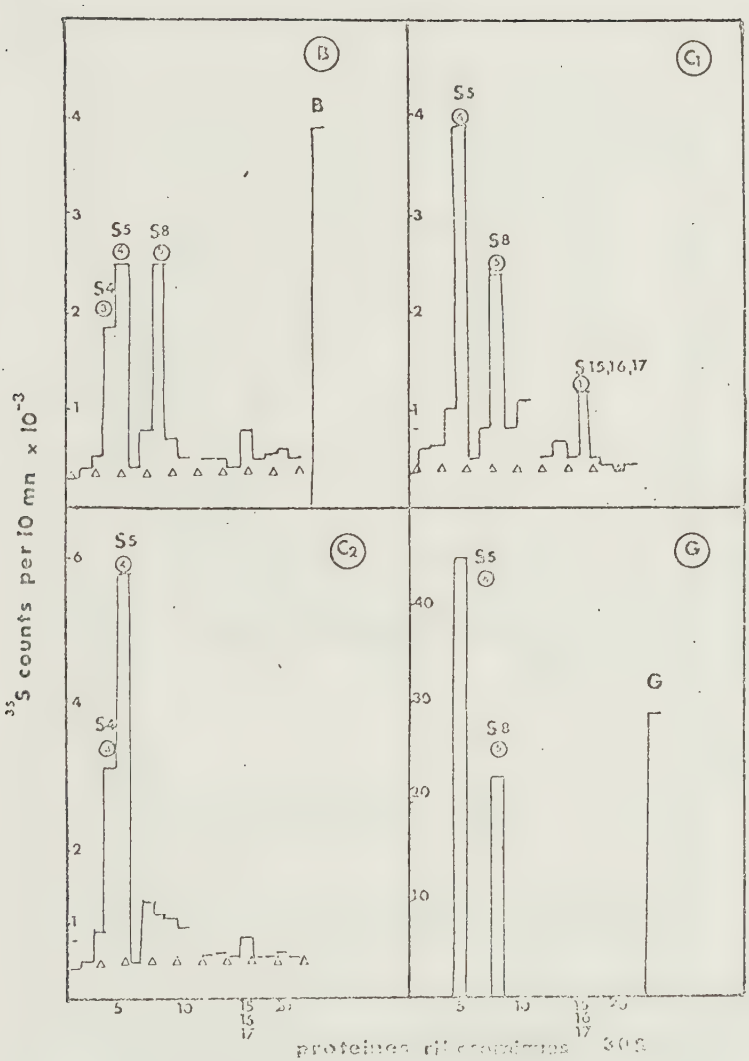


FIGURE 49 et FIGURE 50 - Histogramme des produits d'ammonolyse des complexes B, C1, C2, G et I, D1, F1 obtenus par l'action du DM subérimidate sur les sous-unités 30S

Λ Λ bruit de fond du compteur

la radioactivité restant à l'emplacement du complexe de départ est indiquée dans B, G, F1

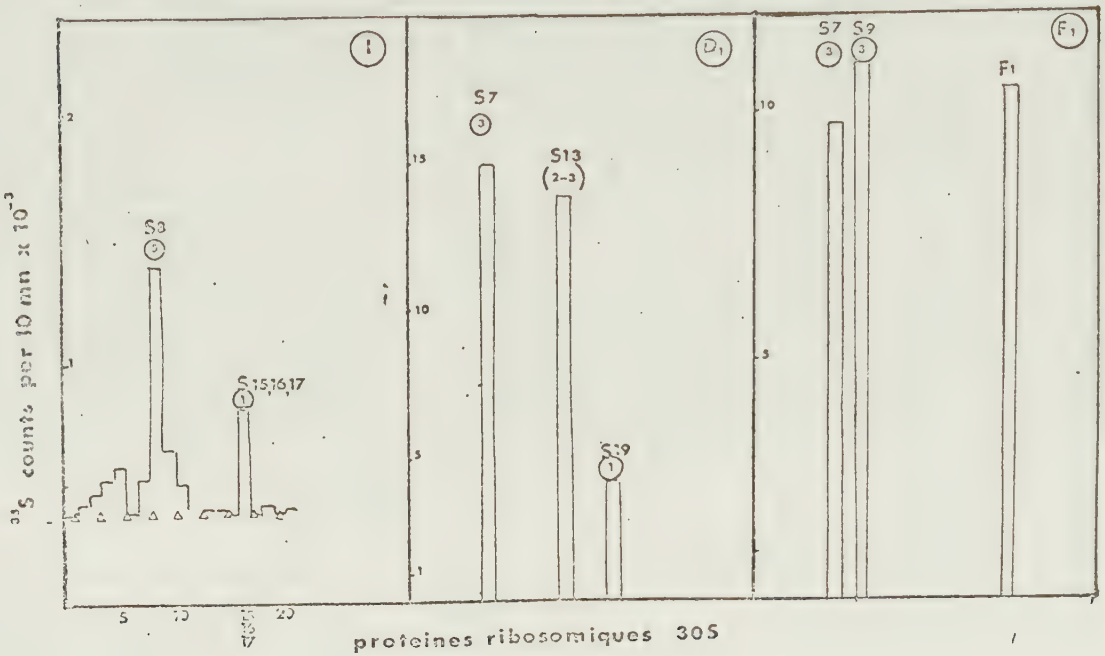

^{35}S counts per 10 mn x 10^{-3}
S3
S15,16,17
S7
S13
(2-3)
S19
S7
S9
F1
proteines ribosomiques 30S

FIGURE 50

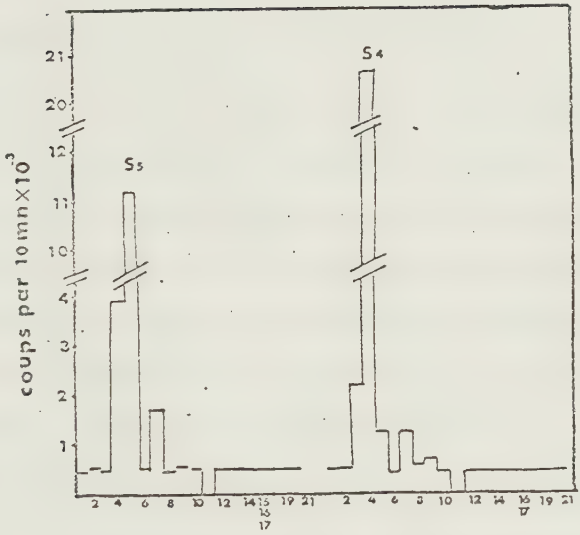


FIGURE 51 - Histogramme de deux produits obtenus après traitement de ribosomes 30S S^{35} par le DM subérimidate et migrant à l'emplacement des protéines S4 et S5. Ces produits sont ammonolysés et étudiés à nouveau en deux dimensions, et correspondent bien aux protéines S4 et S5.

valent de soufre est estimée avec la protéine S5 à 500 cp/10 min. ; nous mesurons 1350 coups/10 min. au-dessus du bruit de fond, et pour la protéine S8, la radioactivité devrait être de 2500 coups/10 min. et nous mesurons 2000 coups. Cependant, nous pensons qu'il s'agit bien d'un complexe trimère des protéines S4, S5, S8 car nous obtenons ce résultat d'une manière reproductible. Par ailleurs, l'autoradiographie de cette plaque nous permet de ne détecter que les protéines S4, S5 et S8. Le point isoélectrique de la protéine S8 étant voisin du pH utilisé lors de la première dimension (116), une fraction de la population de la protéine S8 ne pénètre pas dans le gel, et se perd lors de la dialyse ; cette perte est variable d'une électrophorèse à l'autre et nous permet d'expliquer nos résultats. Le tableau VIII résume les résultats obtenus pour les produits de pontage présentés dans les figures 49 et 50. Les complexes B, CI, C2, G, I migrent les uns au-dessous des autres dans la séparation sur plaque en deux dimensions et leurs positions respectives sont compatibles avec la somme des poids moléculaires des protéines présentes dans chacun de ces complexes. Les histogrammes correspondant aux protéines présentes dans les taches S4 et S5 sont présentés dans la figure 52. Les produits principaux correspondent bien aux protéines S4, S5. Des études analogues faites avec le DM adipimidate et le DM succinimidate ont permis de montrer que certains de ces complexes (B1, C2, G et F1) obtenus par action du DM adipimidate étaient identiques à ceux obtenus avec le DM subérimidate et que les protéines S5 et S8 (G) étaient également pontées par le DM succinimidate.

C) Analyse des produits de pontage de la sous-unité ribosomique 50S par le DM subérimidate

La sous-unité ribosomique 50S, marquée au soufre 35 et portée par le DM subérimidate est analysée de la même manière que la sous-unité 30S. Un schéma de cette séparation et de la nomenclature des complexes formés a été présenté dans la figure 46. Les résultats obtenus dans l'analyse des complexes 1, 4, 19, et H sont présentés dans la figure 52 et le tableau IX. Afin de pouvoir interpréter ces histogrammes, un tableau (X) indique le nombre d'atomes de soufre présents dans chaque protéine ribosomique de la sous-unité 50S. Ce nombre est calculé à l'aide de données publiées (107, 108, 222) comme pour les protéines de la sous-unité 30S. Le complexe n°1 contient les quatre protéines L2, L20, L27, L32-33. Le poids moléculaire de ce complexe est compatible avec sa position dans la séparation électrophorétique en deux dimensions des produits de pontage de la sous-unité 50S par le DM subérimidate. Le complexe 4 contient essentiellement les protéines L2-L13-L20 ; le complexe 19, les protéines L10 et L11 et le complexe H, les protéines L17 et L19. D'autres complexes ont également été analysés, mais les résultats nécessitent d'autres études.

III - DISCUSSION

L'estimation exacte du nombre d'atomes de soufre présents dans chaque protéine est lié à la précision des mesures des poids moléculaires et de pourcentages de méthionine et de cystéine. Ces

Bilan des expériences de pontage par le D.M. succinimidate, adipimidate, et subérimidate

complexes (nomenclature et réactif utilisé)	n°	P.M.	protéine nombre de soufre	cp/10mn -B.F.	cp/10mn / S	Σ P.M. calculé	P.M. mesuré
B (DMS, DMA)	S4 S5 S8	26,7 19,6 15,5	3 4 5	1350 2000 2000	450 500 400	61,8	59,0
C1 (DMS)	S5 S8 S15 16 ou17	19,6 15,5 12,5, 11,7 ou10,9	4 5 1-2	3400 1900 700	850 380 350 à 700	47.6 46	46.0
C2 (DMS, DMA)	S4 S5	26,7 19,6	3 4	2700 5200	900 1300	46,3	46,0
G (DMS,DMA, DMSuc)	S5 S8	19,6 15,5	4 5	45000 22000	9000 4400	35,1	34,0
I (DMS)	S8 S15 16 ou17	15,5 12,5 11,7 ou10,9	5 1-2	900 300	180 150à300	28 26,4	26,0
D1 (DMS)	S7 S13 S19	22,7 14,9 13,1	3 2-3 2	14500 13800 3500	4800 4600-6900 1750	50,7	
F1 (DMS,DMA)	S7 S9	22,7 16,2	3 2-3	2400 10500	3100 3500-5200	38,9	35,0

TABLEAU IX

complexe	Protéine			c.p. 10 min. - B.F.	cp 10min. / S
		10^{-3} x P.M.	nombre d'atome de S		
1	L2	28.8	9	3300	370
	L20	17.4	2	300	150
	L27	12.7	1	300	300
	L32.33	10	?(1-2)	300	
4	L2	28.8	9	10200	1130
	L13	17.8	3	3500	1750
	L20	17.4	2	2500	1250
19	L10	19	6-7	2700	390-450
	L11	19.6	7	2100	300
H	L17	16.7	6	7800	1300
	L19	15	3	2600	900

FIGURE 52 - HISTOGRAMME DES PRODUITS D'AMMONOLYSE DES COMPLEXES 1, 19, 4 et H APRES ACTION DU D.M. SUBERIMIDATE SUR DES RIBOSOMES 50S.

▽▽ bruit de fond
□ protéine non comptée

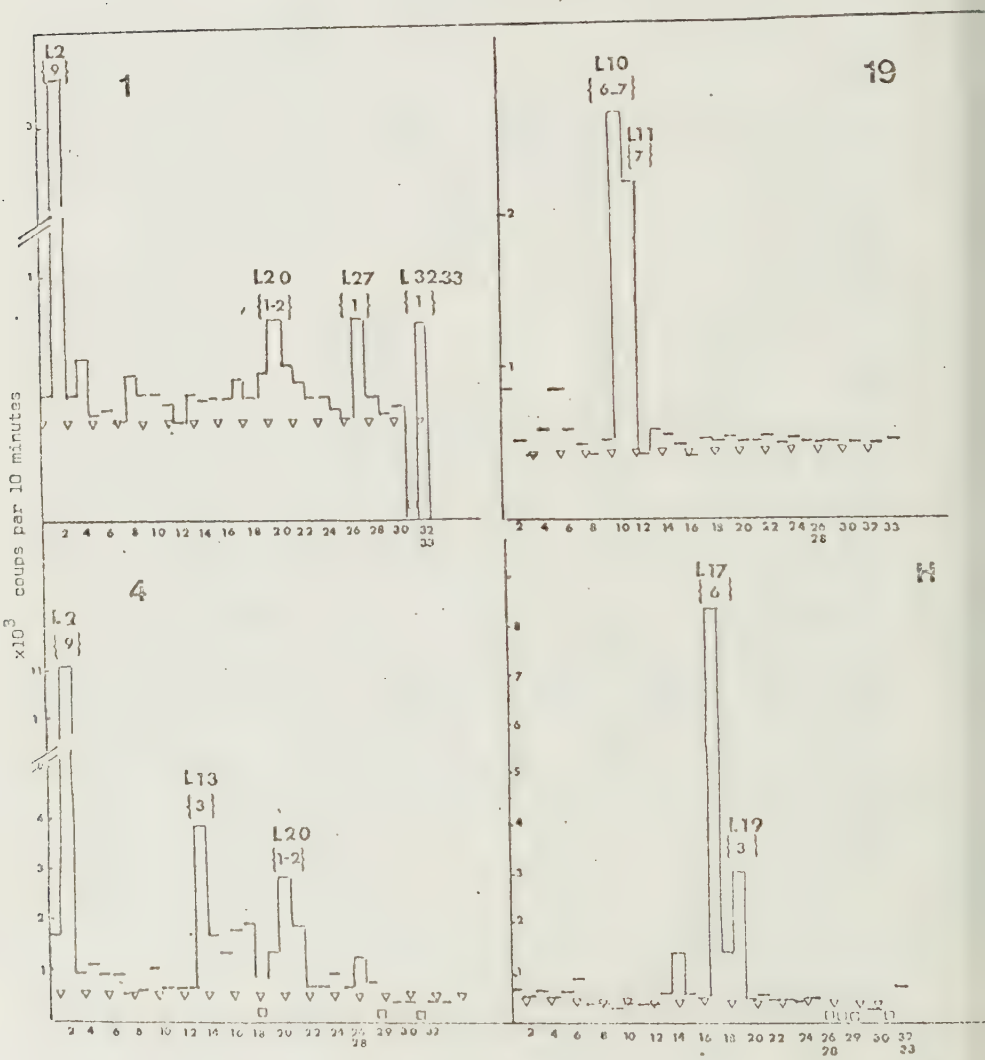


TABLEAU X

Distribution des atomes de soufre dans les protéines du ribosome 50S

Protéines	P.M. x10^3	Nombre de méthionine	Nombre de cystéine (Bakerdjiava et Crichton)	Nombre de soufre
L1	26,7	5,4		5-6
L2	28,8	5	4	9
L3	27	4,6		4-5
L4	25,6	5,1		5
L5	22	4,7	1-2	6-7
L6	21,2	4,9	3	7-8
L7	12,5	2,5		3
L8	17,3	{ 5		{ 5
L9	17,3			
L10	19	4	2,5	6-7
L11	19,6	4,6	2,5	7
L12	13,2	2,5		3
L13	17,8	2,8		3
L14	16,2	4,2	2	6
L15	17,5	1,9	0,9	3
L16	17,9	5		5
L17	16,7	4	1,9	6
L18	14,3	1,6		1-2
L19	14,9	1,8		2
L20	17,4	0,65	1,1	1-2
L21	13,9	2,1		2
L22	14,8	2,5		2-3
L23	12,7	2,2		2
L24	14,5	1,1		1
L25	12	2,8		3
S20= L26	12	2,7		3
L27	12,7	0	1,3	1
L28	12,3	1,1	5	6
L29	12	1,6		1-2
L30	11	2,4		2-3
L31	10	?		?(+)
L32	10,5	?		?(x)
L33	10,5	0		?(x)
L34	9,6	?		?(x)

(x) visible en autoradiographie
(+) pas visible en coloration

valeurs peuvent varier selon les souches d'*E.coli* étudiées et selon les auteurs, et nous pensons que les chiffres que nous avons proposés sont probablement dans certains cas supérieurs ou inférieurs d'une unité à la valeur réelle. Le marquage au S^{35} ayant lieu pendant 7 à 8 générations, nous estimons l'effet d'une dilution isotopique due aux protéines ribosomiques froides et présentes avant le marquage comme négligeable. Bien que la caractérisation des protéines dans chacun des complexes obtenus ne soit pas totalement achevée dans l'étude de la sous-unité 30S, et de la sous-unité 50S, nous pouvons essayer de comparer nos résultats avec ceux obtenus dans d'autres études.

a) sous-unité 30S

- complexes S4 S5, S4 S5 S8, S5 S8, S5 S8 S15, 16 ou 17, S8 S15, 16 ou 17.

Le voisinage des protéines S5 et S8 est en bon accord avec les résultats obtenus dans la carte d'assemblage de la sous-unité 30S où il a été montré que S8 stimule fortement l'attachement de S5.

Par ailleurs, la digestion par la Rnase T1 de sous-unités ribosomiques 30S a permis d'obtenir des fragments de ribosomes et les protéines présentes dans quelques fragments ont été identifiées (161-163). Les groupes S5-S8-S15 ; S5-S8-S15, 16 ou 17 ; S4-S5-S8-S15-S16 ou 17-S20 sont présents dans trois fragments.

Par des approches génétiques on a pu mettre en évidence une interdépendance des protéines S4 et S5 puisque un certain nombre de mutants streptomycine dépendants (mutés dans la protéine S12 - 224, 225) peuvent par reversion supprimer cette dépendance. Les protéines

S4 ou S5 sont les deux seules protéines pouvant être impliquées dans ces reversions, suggérant ainsi une forte interaction de la protéine S12 qui confère la dépendance à la streptomycine et des protéines S4 et S5 qui suppriment cette dépendance (226). Nous n'avons cependant pas encore caractérisé de complexes S4-S12 ; S5-S12 ou S4-S5-S12, mais ces données sont explicables par un voisinage des protéines S4 et S5.

- la résolution que nous obtenons dans la séparation sur plaque des protéines S15 S16 et S17 n'est pas suffisante et ne nous permet pas de déterminer laquelle de ces trois protéines est pontée à S8. Il a été montré dans une étude sur la localisation des sites de fixation des protéines 30S le long de l'ARN 16S que les protéines S8 et S15 interagissent directement avec l'ARN 16S dans des sites très proches (227). L'étude des complexes ainsi formés par l'action des diméthyl succirimidate et adipimidate nous permet de conclure, d'une part, que les groupes NH_2 réactifs des protéines S5 et S8 sont situés à une distance inférieure ou égale à 3,78 A°, que pour S4 et S5, cette distance est comprise entre 3,78 A° et 6,6 A° et que pour S8 et S15, 16 ou 17, les NH_2 réactifs sont distants de plus de 6,3 A° et moins de 8,8 A°. D'autre part, nos analyses préliminaires sur l'ensemble des complexes formés par l'action du DM subérimidate sur le ribosome 30S nous ont montré que les couples de protéines S4-S8 ; S5-S15, 16 ou 17 ; S4-S15, 16 ou 17 n'existent pas. L'ensemble de ces résultats nous conduit à proposer une séquence linéaire de ces quatre protéines S4-S5-S8-S15, 16 ou 17.

- complexes S7-S9 et S7-S13-S19

La fixation de S7 sur l'ARN 16S stimule fortement celles de S9 et S19 lors des expériences de reconstitution qui ont permis d'établir la carte d'assemblage du ribosome 30S

- Deux groupes de fragments de ribosomes obtenus par la digestion par T1 de la sous-unité 30S sont constitués des protéines S7-S9-S19 et S7-S9-S19-S13-S10 (161-163). Le couple S7-S9 n'existe pas après l'action du DM succinimidate mais il est formé par le DM adipimidate : la distance entre les NH_2 réactifs de ces protéines doit être supérieure à 3,78 A° mais inférieure ou égale à 6,6 A°.

b) <u>sous-unité 50S</u>

Une étude analogue est plus difficilement réalisable avec les résultats des pontages entre protéines de la sous-unité 50S car il existe un nombre beaucoup plus faible d'observations.

-complexes L10-L11

Dans des expériences *in vitro* un ordre d'assemblage des protéines L7/L12 ; L10 et L11 a été proposé (228). Des sous-unités 50S lavées à 0°C par une solution de chlorure d'ammonium et d'éthanol perdent les protéines L7 et L12 ; ce même traitement à 37°C élimine L7 L12 et L10 mais un traitement en deux étapes, d'abord à 0°C, puis à 37°C détache les protéines L7 L12 L10 et une partie de L11, L5, L6 et L1. C'est à partir de ces trois types de préparations de sous-unités 50S partiellement déprotéinisées qu'il a été possible en testant la formation du compelxe ribosome-EFG-GDP et par une étude des protéines

sur plaque de conclure que la fixation des protéines L7 et L12 nécessitait la présence de la protéine L10 et que cette protéine L10 ne se fixait qu'après fixation de la protéine L11 ; il semble donc raisonnable de trouver les protéines L10 et L11 voisines. Cette proximité est d'autant plus intéressante que la protéine L11 serait la peptidyltransférase (229-230) et serait localisée près de l'extrémité 3'-terminale du peptidyl ARNt. Des expériences de reconstitution (231) ont montré par ailleurs que la protéine L11 était voisine des protéines du site A, telle les protéines L16 et L6 (160).

- complexe L2-L20-L27-L32 ou 33

Le complexe 1 formé des quatre protéines L2 L20 L27 L32ou 33 contient trois protéines L2 L27 L32 ou 33 qui ont été identifiées par des expériences de marquage par affinité (239-241) comme étant voisines du site P.

- complexe L17-L19

Des digestions ménagées de la sous-unité 50S ont permis d'isoler des fragments de ribosomes et dans certains cas le contenu en ARN et protéines a pu être établi (167). L'existence de deux fragments contenant les protéines L3 L7 L18 L19 ; L3 L4 L24 L13 L14 L17 L19 L22 L23 L29 est en bon accord avec nos résultats sur le complexe H.

IV - CONCLUSION

Si l'ensemble de nos analyses sur les voisinages des protéines ribosomiques dans les sous-unités 30S et 50S ne représentent qu'une partie des résultats à venir, il semble que dans la plupart des cas, diverses approches indépendantes et de natures différentes ont mis en évidence des résultats compatibles avec les voisinages que nous proposons. Par ailleurs, en utilisant des réactifs bifonctionnels, un certain nombre d'autres groupes de recherche ont pu identifier des produits de pontage soit par des techniques immunologiques,soit en utilisant du diméthyl 4-mercaptoburymidate, certains complexes sont identiques aux nôtres (voir figure 7).

Il nous semble cependant prématuré de proposer un modèle décrivant l'ordre d'agencement des protéines bien que nos résultats soient en partie en accord avec les modèles proposés pour la sous-unité 30S (figure 9). En effet, tous les modèles proposés supposent que les protéines soient assimilables à des sphères ; or la seule étude physico-chimique connue (hydrodynamique et diffraction à faible angle des rayons X) entreprise sur les protéines ribosomiques a permis d'estimer à 170 A° x 24 A° la dimension de la protéine S4 (243). Des données plus précises semblent nécessaires pour une représentation de la sous-unité 30S : la forme des protéines, leur position le long de la chaîne de l'ARN doivent être précisées ; par ailleurs, la conformation de la sous-unité 30S proposée doit être compatible avec les résultats obtenus sur les"déroulements"et changements de structure

observés dans diverses conditions de force ionique, en présence de facteurs d'initiation ou de la sous-unité 50S. L'utilisation de réactifs bifonctionnels dans l'étude de changements de conformation des sous-unités ribosomiques permettra peut-être de mesurer certaines variations de distances entre groupes aminés, réactifs de protéines voisines.

BIBLIOGRAPHIE

1. A. Claude, Science 1943, 97 451

2. S.E. Luria, M. Delbruck et T.F. Anderson, J. Bact. 1943, 46 57

3. H.K. Schachmar, A.E. Pardee, et R.Y. Stanier, Arch. Biochem. Biophys. 1952 38 245

4. F.C. Chao, et H.K. Schachman, Arch. Biochem. Biophys. 1956, 61 220

5. P.O.P. Tso, J. Bonner, et J. Vinograd, J. Biophys. biochem. cytol. 1956 2 451

6. E.B. Keller, P.C. Zamecnik, et R.B. Loftfield, J. Histochem. and Cytochem. 1954 2 378

7. J.W. Littlefield, E.B. Keller, J. Gross and P.C. Zamecnik, J. Biol. Chem. 1955, 217 111

8. J.W. Littlefield, et E.B. Keller, J. Biol. Chem. 1957 224 13

9. J.L. Simkin et T.S. Work, Biochem. J. 1957 65 307

10. R.B. Roberts,, R.J. Britten et E.T. Bolton, dans "Microsomal particles and protein synthesis" R.B. Roberts, ed., Pergamon Press, Londres, 1958

11. S. Brenner, F. Jacob, et M. Meselson, Nature 1961, 190, 576

12. A. Tissières, J.D. Watson, D. Schlessinger et B.R. Hollingsworth J. Mol. Biol. 1959 1 221

13. A.S. Spirin 7e FEBS symposium, Varna - Academic Press, Londres, 1972 23 197

14. D. Schlessinger et F. Gros, J. Mol. Biol. 1963 7 350

15. D. Schlessinger, G. Mangiarotti et D.Apirion, P.N.A.S. U.S. 1967 58 1789

16. J. Van Duin, G. van Dieijen, P.H. van Knippenberg et L. Bosch, Eur. J. Biochem. 1970 17 433

17. R.S. Zitomer et J.G. Flaks, J. Mol. Biol. 1972 71 263

18. B. Sabo et A.S. Spirin, Molekular Biology, 1970 4 628

19. N.V. Belitsina, V.A. Rosenblat et A.S. Spirin, Molekular Biology, 1971 5 898

20. A.S. Spirin, B. Sabo et V.A. Kovalenko, FEBS Letters, 1971, 15 197

21. E. Ron, R. Kohler et B. Davies, J. Mol. Biol. 1968 36 83

22. A.R. Subramanian, E. Ron, et B. Davies, P.N.A.S. 1968 61 761

23. N. Lubsen et B. Davis, P.N.A.S., 1972, 69 353

24. D. Kyner et D. Levin, Biochem. Biophys. Res. Comm. 1972 49 1056

25. M. Garcia-Patrone, N. Gonzalez et I. Algranati, FEBS Letters 1972 24 128

26. R. Wettenhall, D. Leader et I. Wool, Biochem. Biophys. Res. Comm. 1971, 43 994

27. J. Pêtre, Eur. J. Biochem. 1970 14 399

28. M. Wabl, P. Barends , et N. Nanninga, Cytobiologie 1973 7 1

29. E. Spiess Cytobiologie 1973 7 28

30. N. Nanninga, P.N.A.S. 1968 61 614

31. F. Amelunken, Cytobiologie 1971 3 111

32. A.S. Spirin, N.A. Kiselev, R.S. Shakulov et A. Bogancv, Biochimiya 1963 28 920

33. V. Vasiliev, FEBS Letters 1971 14 203

34. C.G. Kurland, J. Mol. Biol. 1960 2 83

35. R. Rosset, et R. Monier, Biochim. Biophys. Acta 1963 68 653

36. R. Rosset, R. Monier et J. Julien, Bull. Soc. Chim. biol. 1964 46 87

37. J. Ortega et W. Hill Biochemistry, 1973, 12 3241

38. G.G. Brownlee, F. Sanger, et B.G. Barrell, Nature 1967, 215 735

39. P. Fellner, et F. Sanger Nature 1968 219 236

40. A.I. Apirion, J. Mol. Biol. 1962 5 453

41. F. Sanger, G.G. Brownlee, et B.G. Barrell, J. Mol. Biol. 1965 13 373

42. W. Stanley et R.M. Bock,Biochemistry 1965 4 1302

43. J. Midgley, Biochem. Biophys. Acta, 1965 108 340

70. M. Revel, J.C. Lelong, G. Brawermann et F. Gros, Nature 1968 219 1018

71. M. Springer, J. Dondon, M. Graffe, et M. Grunberg Manago, J. C; Lelong et F. Gros, Biochimie 1971 53 1047

72. S. Ochoa, Molecular Bioenergetics and macromolecular biochemistry edité par Springer, Berlin, Heidelberg, New York, 1972 p. 56

73. M. Revel dans "the mechanism of protein synthesis and its regulation" ed : L. Bosch, North Holland Publ. Co Amsterdam 1972, p. 87

74. J. Lucas Lenard et A.L. Haenni, P.N.A.S. 1969 63 93

75. F. Chapeville et A.L. Haenni, Bull. Soc. Chim. biol. 1969 51 1459

76. F. Lipmann Science 1969 164 1024

77. M.R. Capecchi et H.A. Klein Cold Spring Harbor Symp. Quant. Biol. 1969 34 469

78. A.R. Subramanian, E.Z. Ron, et B.D. Davies, P.N.A.S. 1968 61 761

79. S.L. Gupta et coll. Biochemistry 1971 10 4410

80. P. Lengyel et D. Soll, Protein synthesis in bacteria, Bact. rev. 1969 33 264

81. M. Grunberg Manago, Th. Godefroy-Colburn, A. Wolfe, P. Dessen, D. Pantaloni, M. Springer, M. Graffe, J. Dondon et A. Kay, dans "Regulation of transcription and translation in eukaryotes" E.Bautz, P. Karlson et H. Kersten eds, Springer-Verlag, 1973 p. 213

82. G.G. Brownlee, F. Sanger, J. Mol. Biol. 1967 23 337

83. G.G. Brownlee, F. Sanger, et B.G. Barrell, J. Mol. Biol. 1968 34 379

84. B. Jarry et R. Rosset, Mol. gen. genet. 1971 113 43

85. B. DuBuy, et S. Weissmann, J. Biol. chem. 1971 246 747

86. C. Ehresmann, P. Fellner et J-P. Ebel, Nature 1970 227 1321

87. P. Fellner, C. Ehresmann et J. P. Ebel, Cold Spring Harbor Symp. Quant. Biol. 1970 35 29

88. P. Fellner, C. Ehresmann, et J-P. Ebel, Eur. J. Biochem. 1970 13 583

89. C. Ehresmann, P. Fellner, et J.P. Ebel, FEBS Letters, 1971 13 325

90. P. Fellner, C. Ehresmann, P. Stiegler, et J.P. Ebel, Nature New Biol. 1972 239 1

91. C. Ehresmann, J.L. Fischel, P. Fellner et J.P. Ebel in "functional units of protein biosynthesis" (7th FEBS meeting, Varna, 1971) Academic Press, 1972 p.41

44. P. Sarkar, J. Yang et P. Doty, Biopolymers 1967 5 1

45. A. Klug. K.C. Holmes, et J.T. Finch, J. Mol. Biol. 1961 3 87

46. A.S. Spirin, Macromolecular structure of ribonucleic acids, Reinhold, 1964

47. P. Mc Phie, et W.B. Gratzer, Biochemistry, 1966, 5 1310

48. B.F. Clark et K. Marker, Nature 1966 211 378

49. W. Stanley, M. Salas, A. Wahba et S. Ochoa, P.N.A.S. 1966, 56 290

50. J. Eisenstadt et G. Brawerman, Biochemistry 1966 5 2777

51. Y. Nishizuka et F. Lipmann, P.N.A.S. 1966 55 212

52. H.P. Ghosh et H.G. Khorana, J. Mol. Biol. 1967 25 275

53. D. Schlessinger, G. Mangiarotti et D. Apirion, P.N.A.S. 1967 56 1782

54. M. Mukundan, J.W.B. Hershey, K. Dewey et R. Thach, Nature 1968 217 1013

55. F. Cuzin, N. Kretchmer, R. Greenberg, R. Hurwitz et F. Chapeville P.N.A.S. 1967 58 2079

56. S. Brenner, A.O. Stretton et S. Kaplan, Nature 1965 206 994

57. J. Gordon P.N.A.S. 1967 58 1574

58. J. Gordon P.N.A.S. 1968 59 179

59. R.E. Monro, et K.A. Marker, J. Mol. Biol. 1967 25 347

60. R.E. Monro, J. Mol. BIol. 1967 26 147

61. R. De Wachter et coll.,Eur. J. Biochem. 1971 22 4ol

62. M. Revel, M. Herzberg. A. Bacarevic et F. Gros, J. Mol. Biol. 1968 33 231

63. M. Momura, et C.V. Lowry, P.N.A.S. 1967 58 946

64. J. Hershey, K. Dewey et R.Thach, Nature 1969 222 944

65. M. Kondo, G. Eggerston, J. Eisenstadt et P. Lengyel, Nature 1968 220 368

66. J.A. Steitz, Nature 1969 224 957

67. J.S. Anderson, M.S. Bretscher, B.F. Clark et K. Marker, Nature 1967 215 490

68. R.E. Monro, T. Staehlin, M. Celma et D. Vasquez, Cold Spring Harbor Symposium Quant. Biol. 1969 34 357

69. J. Lucas Lenard et F. Lipmann, P.N.A.S. 1967 57 1050

92. P. Fellner, C. Ehresmann, et J-P. Ebel, Biochimie, 1972 54 853

93. C. Ehresmann, P. Stiegler, P. Fellner et J. P. Ebel, Biochimie, 1972 54 901

94. J. Shine, et L. Dalgarno, P.N.A.S. 1974 7 1342

95. P. Fellner, et J.P. Ebel, FEBS Letters 1970 6 102

96. J.P. Ebel, P. Fellner, C. Ehresmann, P. Stiegler, J. Fischel, C. Branlant A. Krol et J. Sriwidada, Communication au Congrès FEBS, Budapest 1974

97. R.A. Cox, communication personnelle

98. E. Kaltschmidt, et H.G. WIttmann, P.N.A.S. 1970 67 1276

99. R.R. Traut, P.B. Moore, H. Delius, H. Noller, et A. Tissières, P.N.A.S. 1967 57 1294

100. P.B. Moore, R.R. Traut, H. Noller, P. Pearson et H. Delius, J. Mol. Biol. 1966 31 441

101. R.R. Traut, J. Mol. Biol. 1966 21 571

102. S.J.S. Hardy, C.G. Kurland, P. Voynow, et G. Mora, Biochemistry 1969 8 2897

103. G.R. Craven, P. Voynow, S.J.S. Hardy et C.G. Kurland, Biochemistry 1969 8 2906

104. P.S. Sypherd, D.M. O'Neil, et M.M. Taylor Cold Spring Harbor Symp. Quant. Biol. 1969 34 77

105. R.R. Traut, H. Deluis, C. Ahmad-Zadeh, T.A. Bickle, P. Pearson, et A. Tissières, Cold Spring Harbor Symp. Quant. Biol. 1969 34 25

106. C.G. Kurland, P. Voynow, S.J.S. Hardy, L. Randall et L. Lutter, Cold Spring Harbor symp. Quant. Biol. 1969 34 17

107. E. Kaltschmidt, M. Dzionara, et H.G. Wittmann, Mol. Gen. Genet. 1970 109 292

108. M. Dziorara, E. Kaltschmidt, et H.G. Wittmann, P.N.A.S. 1970 67 1909

109. S. Fogel, et P.S. Sypherd, P.N.A.S. 1968 59 1329

110. G. Mora, D. Donner, P. Thammana, L. Lutter, et C.G. Kurland, Mol. gen. genet. 1971 112 229

111. I. Hindenach, G. Stöffler, et H.G. Wittmann, Eur. J. Biochem. 1971 23 7

112. I. Hindenach, E. Kaltschmidt, et H.G. Wittmann, Eur. J. Biochem. 1971 [illegible]

113. P. Pearson, H. Deluis, et R.R. Traut, Eur. J. Biochem. 1972 27 482

114. P. Voynow, et C.G. Kurland, Biochemistry 1971 10 517

115. W. Möller, A. Groene, C. Terhorst, et R. Amons, Eur. J. Biochem. 1972 25 5

116. H.J. Weber, Mol. gen. genet. 1972 119 233

117. E. Deusser, Mol. Gen. genet. 1972 119 249

118. P. Thammana, C.G. Kurland, E. Deusser, J. Weber, R. Maschler, G. Stöffler, et H.G. Wittmann, Nature New Biol. 1973 242 47

119. P.H. Van Knipperberg, P.J.J. Hooykaas et J. Van Duin, FEBS Letters 1974 84 249

120. E. Deusser, H.J. Weber, et A.R. Subramanian, J. Mol. Biol. 1974 84 249

121. C. Terhorst, B. Wittmann-Liebold, et W. Möller, Eur. J. Biochem. 1972 25 13

122. B. Wittmann-Liebold, FEBS Letters 1973 36 247

123. B. Wittmann-Liebold, Hoope Seylers Z. physiol. Chem. 1973 354 1415

124. M. Yaguchi, C. Roy, A.T. Matheson, et L.P. Visentin, Can. J. Biochem. 1973 51 1215

125. P. Traub, et M. Nomura, P.N.A.S. 1968 59 777

126. P. Traub et M. Nomura, J. Mol. Biol. 1969 40 391

127. S. Mizushima, et M. Nomura, Nature 1970, 226 1214

128. W. Held, B. Ballar, S. Mizushima, et M. Nomura, J. Biol. Chem. 1974 249 3103

129. M. Ozakai, S. Mizushima, et M. Nomura, Nature 1969 222 333

130. A. Bollen, J. Davies, M. Ozaki, et S. Mizushima, Science 1969 165 65

131. M. Nomura, et V. Erdmann, Nature 1970 228 744

132. S. Fahnstock, V. Erdmann, et M. Nomura, Biochemistry 1973 12 220

133. K. Nierhaus et F. Dohme, P.N.A.S., sous presse

134. H.W. Schaup, M. Green et C.G. Kurland, Mol. gen. genet. 1970 109 193

135. H.W. Schaup, M. Green et C.G. Kurland, Mol. gen. genet. 1971 112 1

136. H.W. Schaup, M. Sogin, C. Woese, et C.G. Kurland, Mol. gen. genet. 1971 114 1

137. H.W. Schaup, et C.G. Kurland, Mol. gen. genet. 1972, 114 350

138. R.A. Zimmermann, A. Muto, P. Fellner, C. Ehresmann, et C. Branlant P.N.A.S. 1972 69 1282

139. A. Muto, C. Ehresmann, P. Fellner, et R. Zimmermann, J. Mol. Biol. 1974 86 411

140. R. Zimmermann, A. Muto, C. Mackie, J. Mol. Biol. 1974 86 433

141. N. Nanninga, R.A. Garrett, G. Stöffler et G. Klotz, Mol. gen. genet. 1972, 119 175

142. P.N. Gray, R. Monier, Biochimie, 1972, 54 41

143. P. Gray, G. Bellemare et R. Monier, FEBS Letters 1972 24 156

144. P.N. Gray, R.A. Garrett , G. Stöffler et R. Monier, Eur. J. Biochem. 1972 28 412

145. P.N. Gray, G. Bellemare, R. Monier, R.A. Garret et G. Stöffler, J. Mol. Biol. 1973 79 133

146. B. Allet et P.F. Spahr, Eur. J. Biochem. 1971 19 250

147. G. Stöffler, L. Daya, K.H. Rak, R.A. Garrett, J. Mol. Biol. 1971 62 411

148. R.R. Crichton, et H.G. Wittmann, P.N.A.S. 1973 70 665

149. C.G. Kurland, communication personnelle

150. G.R. Craven et V. Gupta, P.N.A.S. 1970 67 1321

151. F.N. Chang et J.G. Flasks, P.N.A.S. 1970 67 1329

152. P. Spitnik Elson et Breiman, Biochim. Biophys. Acta, 1971, 254 457

153. R.R. Crichton et H.G. Wittmann, mol. gen. genet. 1971 114 95

154. G. Stöffler, et H.G. Wittmann, P.N.A.S. 1971, 68 2283

155. G. Stöffler et H.G. Wittmann, J. mol. biol. 1971 62 407

156. C.A. Morrison, R.A. Garrett, H. Zeichardt, et G. Stöffler, Mol. gen. genet. 1973 127 359

157. J.H. Highland, J.W. Bodley, J. Gordon, R. Hasenbank et G. Stöffler P.N.A.S. 1973 70 142

158. A. Czerlinofsky, E.E. Collatz, G. Stöffler, et E. Kuechler, P.N.A.S. 1974 71 230

159. J.C. Lelong, D. Gros, F. Gros, A. Bollen, R. Moschler, et G. Stöffler P.N.A.S. 1974 71 246

160. O. Pongs, K. Nierhaus, V.A. Erdmann et H.G. Wittmann, FEBS Letters 1974 40 528

161. R. Brimacombe, J.M. Morgan et R.A. Cox, Eur. J. Biochem. 1971 23 52

162. R. Brimacombe, J. M. Morgan, D.G. Oakley, R.A. Cox, Nature New Biology 1971 231 209

163. J.M. Morgan et R. Brimacombe, Eur.J. Biochem. 1973 37 472

164. P. Schendel, P. Malba et R. Craven, P.N.A.S. 1972 69 544

165. H. Kagawa, H. Tokimatsu et L. Jishuken, J. Biochem. 1972 72 827

166. H.E. Roth et K.H. Nierhaus F.E.B.S. Letters 1973 31 35

167. H.E. Roth et K.H. Nierhaus, communication à la réunion EMBO sur les ribosomes Göteborg, 1974

168. T.A. Bickle, J.W.B. Hershey, et R.R. Traut, P.N.A.S. 1972 69 1327

169. C. Clegg, et D.H. Hayes, C.R. Acad. Sci. Paris, 1972 275 1819

170. L.C. Lutter, H. Zeichardt, et C.G. Kurland, mol. gen. genet. 1972 119 357

171. F.N. Chang, et J.G. Flasks, J. Mol. Biol. 1972 68 177

172. R.R. Traut, A. Bollen, T.T. Sun, J.W.B. Hershey, J. Sundberg et L.R. Pierce, Biochemistry 1973 12 3266

173. C. Clegg et D.H. Hayes, Eur. J. Biochem. 1974 42 21

174. R.R. Traut et coll. résultats non publiés, présentés à la réunion EMBO sur le ribosome, Göteborg, 1974

175. D. Elson, et coll., résultats non publiés, présentée à la réunion EMBO sur le ribosome, Göteborg, 1974

176. D. Barritault, J.C.S. Clegg, A. Expert Bezançon, M. Milet, et D.H. Hayes, résultats non publiés, présentés à la réunion EMBO sur le ribosome, Göteborg 1974

177. D. Barritault, A.E. Expert-Bezançon, M. Milet et D.H. Hayes manuscrit soumis à FEBS Letters

178. A.E. Expert Bezançon, D. Barritault, M. Milet, D.H. Hayes et J.C.S. Clegg, manuscrit soumis à Nature

179. M.R. Wabl, J. Mol. Biol. 1974 84 241

180. G. Stöffler et T. Tischendorff, Résultats non publiés, présentés à la réunion EMBO sur les ribosomes, Göteborg, 1974

181. A. Bollen, R.J. Cedergren, D. Sankoff, et G. Lapalme, Biochem. Biophys. res. comm. 1974 59 1089

182. W.Salser, R.F. Gesteland et A. Bollen, Nature, 1967, 215 580

183. W. Salser, R.F. Gesteland, et B. Ribeard, Cold Spring Harbor Symp. Quant. Biol. 1969 34 771

184. M.F. Guérin, et D.H. Hayes, résultats non publiés

185. F. Solymosy; I. Fedorcsàk, A. Gulyàs, Eur. J. Biochem., 1968, 5, 520

186. G. Farkas, L. Ehrenberg, Eur. J. Biochem. 1968 5 520

187. A. Expert Bezançon, M.F. Guérin, D.H. Hayes, L. Legault et J. Thibault Biochimie, 1974 56 77

188. D. Barritault, A. Expert-Bezançon, M.F. Guérin et D.H. Hayes, Biochimie 1974 56 711

189. Z. Dische, dans "The Nucleic Acid" E. Chargaff et J. Davidson editors, Academic Press, New York, 1955, vol 1 p. 285

190. J. Furth et L. Piza, J. Mol . Biol. 1966 15 124

191. A. Aronson et B. Mac Carthy, Biophys. J. 1961 1 215

192. P. Sypherd, J. Mol. Biol. 1971 56 311

193. J.P. Waller et J. Harris, P.N.A.S. 1961 47 18

194. S. Hardy, C. Kurland, P. Voynow et G. Mora, Biochemistry 1969 8 2897

195. M.F. Guérin, et D.H. Hayes, Anal. biochem. 1973 55 297

196. A. Danchin, communication personnelle

197. R. Cox, Biochem. J. 1966 98 841

198. J.D. Roberts, J. Ladner, J. Finch, J. Rhodes, D. Brown, B. Clark et A. Klug, Nature 1974 250 546

199. S. Kim, G. Quyley, F. Suddath, A. Mc Pherson, D. Sneden, J. Kim, J. Weinzierl et A. Rich, Science 1973 285

200. D.H. Hayes, F. Hayes, et M.F. Guérin, J. Mol. biol. 1966, 18 515

201. V. Loening , Biochem. J. 1967 102 251

202. D. Barritault et D.H. Hayes Anal. Biochem. 1973 53 272

203. A. Dahlberg, C.W. Dingman, A. Peacock, J. mol. biol. 1969 41 139

204. R. Vigne et B.R. Jordan Biochimie 1972 53 981

205. F. Sanger, G. Brownlee et B. Barrell, J. Mol. Biol. 1965 13 373

206. G. Brownlee, et E. Cartwright, Nature New Biol. 1971 232 50

207. H. Ansker, FEBS Letters 1970 7 293

208. V. Loening, cours d'été Weissmann Institute, Israël, 1971

209. E. Kaltschmidt et H.G. Wittmann, Anal. Biochem. 1970 36 401

210. F. Galibert, M.E. Eladari, A. Hampe et M. Boirou, Eur. J. Biochem. 1970, 13 273

211. P. Tiollais, F. Galibert et M. Boirou, P.N.A.S. 1971 68 1117

212. D. Barritault et D.H. Hayes, manuscrit en préparation

213. L. Lutter et C. Kurland, Nature New Biology, 1973 243 15

214. C. Davies, et G. Stark, P.N.A.S. 1970 47 18

215. D. Elson, catalogue Yeda, Israël, 1971

216. S. Avital et D. Elson, Anal. biochem. 1974 57 274

217. D. Barritault, A. Expert-Bezançon, M. Milet et D.H. Hayes, soumis à Anal. biochem.

218. C.A. Howart et R.R. Traut, FEBS LEtters 1973 29 177

219. J. Maizel dans "Methods in virology" edité par Maramorosch et Kraprowski 1971, vol. V, Academic Press, New York, p. 179

220. U.K. Laemmli, Nature 1970 227 680

221. A. Acharya et P.B. Moore, J. mol. biol. 1973 76 207

222. A. Bakordjieva et R. Crichton, Biochemical journal, sous presse

223. L. Kahan, W. Held, et M. Nomura, J. Mol. Biol. 1974 86 797

224. M. Ozaki, S. Mizushima and M. Nomura, Nature 1969 222 333

225. E.A. Birge et C.G. Kurland, Science 1969 166 1282

226. R. Hasenbank, C. Guthrie, G. Stöffler, H.G. Wittmann, L. Rosen, D. Apirion, mol. gen. genet. 1973 127 1

227. C. Ehresmann, P. Stiegler, P. Fellner, J.P. Ebel, E. Ungewickell et R. Garrett, communication à la réunion EMBO sur le ribosome Göteborg, 1974

228. G. Howard et J. Highland, réunion EMBO sur le ribosome, Göteborg 1974

229. K. Nierhaus, et V. Montejo, P.N.A.S. 1973 70 1931

230. N. Hsiung, S. Reines et C.R. Cantor, manuscrit en préparation

231. S. Diedrich, J. Schrandt et K. Nierhaus, manuscrit en préparation

232. A. Kay, M. Sander et M. Grunberg Manago, Biochem. biophys. res. comm. 1973 52 792

233. K. Kisha, W. Möller et G. Stöffler, Nature 1971, 233 62

234. J.P.G. Ballesta, et D. Vazquez, FEBS Letters, 1972 28 337

235. G. Sander, R.C. Marsh et A. Parmeggiani, Biochem. biophys. res. comm. 1972 47 866

236. P. Schrier, J.A. Maassen et W. Möller, Biochem. biophys. res. comm. 1973 53 90

237. G. Stöffler, R. Hasenbank, J.W. Bodley, et J.H. Highland, J. Mol. Biol. 1974

238. R. Hauptmann, A.P. Czerlinofsky, H.G. Voorma, G. Stöffler et E. Kuchler, Biochem. biophys. res. comm. 1974 56 331

239. D.D. Eilat, M. Pellegrini, H. Oen, N. de Groot, Y. Lapidot et C. Cantor, Nature 1974 250 514

240. C. Cantor et coll., réunion EMBO sur les ribosomes, Göteborg 1974

241. J. Horne et V. Erdmann, mol. gen. genet. 1972 119 337

242. Paradies, résultats non publiés, et Zeichardt, communication personnelle

243. E. Egberts, P. Traub, P. Herrlich, et M. Schweiger, Biochim. biophys. acta, 1972, 277, 681